



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2009

**Cláudia Andreia
Martins Oliveira**

Estudos de permeação através da pele



**Cláudia Andreia
Martins Oliveira**

Estudos de permeação através da pele

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química realizada sob a orientação científica da Dr. Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Prof. Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin
Professor Associado com agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Alberto António Caria Canelas Pais
Professor Associado com agregação da Faculdade de Ciências e
Tecnologias da Universidade de Coimbra

Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes
Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de
Aveiro

agradecimentos

Queria agradecer a todas as pessoas que directamente ou indirectamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial queria agradecer à Dr. Maria Teresa Gomes pelo apoio, orientação e motivação que me foi prestando ao longo de todo o trabalho. Ao Dr. João Oliveira, o meu muito obrigado, pela disponibilidade e pela ajuda prestada sempre que solicitada.

Agradeço também ao Sr. Júlio e ao Sr. Ivo do Departamento de Física pela ajuda técnica e também pela paciência, não esquecendo também o Sr. Morais do Departamento de Química.

A nível pessoal queria agradecer a todos os meus colegas de laboratório pela ajuda e pelos bons momentos que tornaram este percurso um pouco melhor, sendo eles a Vânia, a Marta, a Eunice e o Nuno.

Aos meus amigos que me aturaram ao longo de todo este tempo, o meu muito, mas mesmo muito obrigado!

Ao Filipe por ter sido o meu grande apoio nos bons e nos maus momentos.

E por último, e não menos importante, queria agradecer aos meus pais pelo apoio e por me terem dado esta oportunidade.

palavras-chave

difusão, permeabilidade, membranas, microbalanças de cristais de quartzo, diclofenac de sódio.

resumo

O diclofenac de sódio é um composto utilizado pela indústria farmacêutica para a produção de medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos. Em alguns casos o diclofenac de sódio é aplicado por via transdérmica e tal como todos os medicamentos, o diclofenac de sódio apresenta alguns efeitos secundários sendo necessário o controlo e por vezes o acerto das suas dosagens nos medicamentos. Ora a dosagem só poderá ser estabelecida conhecendo-se a permeação do medicamento através da pele. Os métodos utilizados para estudar a permeação não permitem geralmente a sua monitorização em tempo real.

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver um novo método analítico baseado em microbalanças de cristais de quartzo para fazer estudos de permeação através da pele. As microbalanças são um método que apresenta um baixo custo, tendo uma funcionalidade simples e versátil e, como se mostra neste trabalho, permitem a realização de estudos de permeação de medicamentos, sem que seja necessário retirar amostras para análise a tempos determinados, alterando a concentração na câmara receptora. No presente trabalho utilizaram-se membranas de celofane, pêssego e tomate, e determinaram-se os coeficientes de difusão e do fluxo do diclofenac de sódio. Os coeficientes de difusão estão todos na ordem de grandeza de 10^{-10} , sendo a do celofane o maior, seguida da membrana do pêssego e por último a do tomate. Estes coeficientes de difusão estão dentro dos valores que se encontram na literatura para a pele (10^{-9} a 10^{-12} cm²/s), pelo que se confirma a sua utilidade nos estudos em que a pele não está disponível. Estudaram-se os efeitos da concentração, não se tendo observado alterações no coeficiente de difusão nas concentrações de 147,1 ppm e 219,1 ppm e concluiu-se que o fluxo é maior para a concentração de 219,1 ppm.

keywords

diffusion, permeability, membranes, quartz crystal microbalance, Sodium diclofenac

abstract

Sodium diclofenac is a compound used by the pharmaceutical industry for the production of anti-inflammatory drugs and analgesics. In some cases, sodium diclofenac is used by transdermal application. Like all drugs, it has some side effects, and for it is necessary to control and accurately control its dosages in medicines. Now this dosage can only be established after knowing the permeation of the drug through the skin. The methods used so far to study the permeation do not allow its monitoring in real time. This work aims to develop a new simpler, easier and cheaper analytical method based on quartz crystals microbalances for studies of permeation through skin. This microbalance is a method simple to use and versatile, which as shown in this work, allows the study of permeation without withdrawing samples for analysis at defined times, which alters the concentration in the receptor chambers. In the present study cellophane membranes, peach and tomato were used, and were determined the diffusion coefficients and permeability of sodium diclofenac. The diffusion coefficients found are all in the 10^{-10} cm²/s range. Cellophane has the largest diffusion coefficient, followed by the membrane of peach and finally comes the tomato membrane. These diffusion coefficients are within the values found in the literature for skin (10^{-9} to 10^{-12} cm²/s), which confirmed the suitability of these membrane models to replace the skin whenever it is not available. We studied the effects of concentration and no changes in the diffusion coefficients were found for concentrations of 147,1 ppm or 219,1 ppm, and we conclude that the flux is higher for the concentration of 219,1 ppm.

Índice

1. Introdução Geral	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1– Diclofenac	3
2.1.1- Diclofenac e as suas propriedades	3
2.1.2- Utilização e acção do diclofenac no organismo	4
2.1.3 - Métodos de análise do diclofenac.....	6
2.2- Microbalança de Cristais de Quartzo.....	9
2.2.1 – Cristais piezoeléctricos de quartzo.....	9
2.2.2 – O sensor baseado em cristais piezoeléctricos de quartzo.....	12
2.2.3 – Os sensores acústicos em líquidos	14
2.3– Revestimento	16
2.3.1 – Escolha do Revestimento.....	16
2.4– Permeabilidade da Pele	19
2.4.1- Pele	19
2.4.2 – Difusão	21
2.4.3 – Testes “InVitro”	27
2.4.4 – Células de permeação	27
2.4.5 – Permeação do diclofenac	29
3. Instrumentação, Arranjo e Procedimento Experimentais	31
3.1- O sensor.....	31
3.1.1 – Reagentes e Material.....	31
3.1.2 - Revestimento do cristal	32

3.1.3 - Descrição da aparelhagem e montagem experimental	33
3.1.4 - Procedimento	34
3.2- A permeação	34
3.2.1 – Reagentes e Material.....	35
3.2.2 - Célula de Difusão	35
3.2.3 – Montagem da célula de difusão	37
3.2.4 – Requisitos experimentais e alterações à montagem inicial.....	38
3.2.5 – Procedimento	41
4.Resultados e discussão	43
4.1 – Testes ao sensor.....	43
4.2 – Testes de permeação.....	49
5. Conclusões.....	59
6.Bibliografia	61

Índice de tabelas

Tabela 2.1 – Nome da IUPAC, fórmula química e a massa molecular do diclofenac.	3
Tabela 2.2 – Composições de diferentes membranas com quatro plastificantes diferentes, e as suas respectivas respostas.....	17
Tabela 3.1 – Reagentes utilizados na primeira parte do procedimento experimental.	31
Tabela 3.2 – Espessuras das respectivas membranas do celofane, pêssago e tomate.	35
Tabela 4.1 – Declive, ordenada na origem e o respectivo coeficiente de correlação para cada revestimento.	48
Tabela 4.2 – Declive, ordenada na origem e o respectivo coeficiente de correlação para cada serpentina.	49
Tabela 4.3 – Valores obtidos da concentração e da variação da frequência para a calibração da membrana do celofane.	51
Tabela 4.4 - Valores obtidos para o tempo de latência e para os coeficientes de difusão para a membrana de celofane, com as velocidades de agitação de 60 e 70 rpm.	54
Tabela 4.5 – Tempo de latência, coeficiente de difusão e fluxo de 147,3,1 ppm e 219,1 ppm na câmara doadora utilizando a membrana de celofane.	55
Tabela 4.6 – Valores obtidos para a Concentração de equilíbrio para cada membrana.	57
Tabela 4.7 – Valores obtidos para o tempo de latência, do coeficiente de difusão e do fluxo para cada membrana com uma velocidade de agitação de 70 rpm.....	57

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Estrutura química do diclofenac de sódio.	4
Figura 2.2 – Conversão do ácido Araquidónico em Prostaglandina.	5
Figura 2.3 – Estrutura cristalina do cristal de quartzo com os respectivos eixos.	10
Figura 2.4 – Cristal piezoelétrico de quartzo.	10
Figura 2.5 – Cortes AT-BT da estrutura cristalina de quartzo	11
Figura 2.6 – Modo de cisalhamento da espessura	11
Figura 2.7 – Cristal de quartzo com eléctrodos e a resposta a uma determinada massa injectada.	13
Figura 2.8 – Modo de cisalhamento para um cristal de quartzo em meio líquido	16
Figura 2.9 – Curva de calibração do revestimento	18
Figura 2.10 – Efeito do pH na resposta do revestimento.	19
Figura 2.11 – Estrutura da pele.	20
Figura 2.12 – Absorção percutânea transcelular e intercelular.	22
Figura 2.13 – Esquema ilustrativo da difusão estacionária através da membrana	23
Figura 2.14 – Representação gráfica da resposta típica das permeações através de membranas.	26
Figura 2.15 – Representação esquemática de uma célula de Franz.	28
Figura 2.16 – Perfil de permeação do diclofenac de sódio através de diferentes membranas.	30
Figura 3.1 – Utilização de uma micropipeta no revestimento do cristal de quartzo.	32
Figura 3.2 – Montagem experimental para os testes com o sensor	33
Figura 3.3 – Esquema ilustrativo da célula de PVC para o cristal piezoelétrico	33
Figura 3.4 – Célula de Franz modificada na horizontal com sensor piezoelétrico.	36
Figura 3.5 – Câmara doador da Célula de Franz modificada.	37
Figura 3.6 – Representação da célula de difusão com o sensor piezoelétrico	37
Figura 3.7 – Montagem experimental para os testes de permeação	40
Figura 4.1 – Gráfico da resposta a uma injeção da solução padrão de diclofenac de sódio. ...	43
Figura 4.2 – Gráficos das curvas de calibração obtidos com cristais com diferentes quantidades de revestimento.	46
Figura 4.3 – Gráfico das rectas de calibração para os revestimentos de 18,1, 16,2,12,2 e 11,6 kHz.	47

Figura 4.4 – Gráfico das curvas de calibração para as serpentinas de 0,5 e 1mL.	48
Figura 4.5 – Frequência em função do tempo, ao longo da calibração.	50
Figura 4.6 – Recta de calibração para a membrana do celofane.	51
Figura 4.7 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação através da membrana do celofane.....	52
Figura 4.8 – Gráfico da concentração em função do tempo para a permeação da membrana de celofane com uma agitação de 60 rpm.....	53
Figura 4.9 – Gráfico da quantidade permeada em função do tempo.	54
Figura 4.9 – Gráficos da permeação na membrana do celofane para as concentrações na câmara doadora de: a) 147,1 ppm e b) 219,1 ppm.	56

Lista de símbolos

Símbolo	Descrição
AINE	Anti-inflamatório não-esteróide
UV-VIS	Ultravioleta - Visível
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
DSC	Calorimetria Diferencial de Varrimento
PVC	Policloreto de vinilo
HDPB	Brometo de hexadecilpiridínio
DBP	Ftalato de dibutilo
THF	Tetrahidrofurano
MCQ	Microbalança de cristais de quartzo
Θ	“time lag”, tempo de latência
P	Coeficiente de permeabilidade
D	Coeficiente de difusão
J	Fluxo
L	Espessura da membrana
T	Tempo
A	Área difusional
Q	Quantidade permeada
K	Coeficiente de partição
X	Coordenada espacial na direcção da difusão
C_1	Concentração à superfície da membrana do lado dador
C_2	Concentração à superfície da membrana do lado receptor

C_0	Concentração da membrana
C	Concentração da câmara receptora
$V_{\text{acumulado}}$	Volume total acumulado
$\Delta F_{\text{acumulado}}$	Variação da frequência acumulada
ΔF_{rev}	Variação da frequência no revestimento
F_i	Frequência inicial
F_f	Frequência final
ΔF	Variação da frequência
$C_{\text{equilíbrio}}$	Concentração de equilíbrio
$C_{\text{câmara doadora}}$	Concentração na câmara doadora
m_{total}	Massa total permeada

1. Introdução Geral

O diclofenac de sódio foi introduzido no Japão em 1974 e nos Estados Unidos em 1989 sendo utilizado nos dias de hoje em cerca de 120 países como o anti-inflamatório não-esteróide (AINE) mais vendido do mundo. Apesar de ser largamente utilizado, este anti-inflamatório é responsável por 25 % das reacções adversas no Reino Unido [1].

A utilização de medicamentos através da pele para o tratamento de inflamações na pele ou no corpo tem sido uma alternativa à administração oral. A necessidade de controlar as dosagens dos medicamentos e as suas formulações, exige que sejam realizados testes de permeação através da pele. O ideal seria realizar os testes em humanos, mas torna-se dispendioso e muitas das substâncias são tóxicas. Os testes são muitas vezes realizados com pele humana, mas em soluções que simulam os fluidos corporais. Em substituição da pele humana são utilizadas membranas artificiais, pele de animais e outras.

Na literatura existem vários estudos de permeação através da pele com o diclofenac de sódio, onde são utilizadas várias técnicas analíticas para a sua determinação. Continua no entanto a existir uma procura por métodos mais eficazes, baratos e simples.

O objectivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de um novo método analítico para a determinação da permeação do diclofenac de sódio através de membranas naturais (ex: pele de frutos). O primeiro passo para alcançar o objectivo principal foi desenvolver um sensor capaz de detectar o diclofenac de sódio. Após o desenvolvimento do sensor houve a necessidade de criar uma célula de difusão que permitisse a utilização do novo sensor baseado em cristais de quartzo, para a realização dos testes de permeação. Por último, a criação de uma montagem experimental de modo a criar as condições necessárias para a realização dos testes de permeação. Depois da concretização dos passos anteriores foi efectuada a análise dos resultados obtidos e concluiu-se sobre a eficácia do método e sua funcionalidade.

Este trabalho está dividido em 6 partes, sendo a primeira parte a introdução geral e a segunda parte a descrição do estado da arte.

A revisão Bibliográfica contempla o diclofenac e as suas propriedades, alguns dos métodos analíticos utilizados na sua determinação, o princípio de funcionamento dos sensores de massa baseados nos cristais de quartzo, a importância do revestimento do

cristal de quartzo no desempenho do sensor, a estrutura e características da pele, bem como a célula de difusão e o modelo utilizado para calcular os coeficientes de difusão e de permeabilidade.

Na terceira parte são apresentados os aspectos experimentais. É discutida toda a montagem experimental e são detalhadas as metodologias e procedimentos experimentais do trabalho.

Na quarta parte do trabalho faz-se a discussão e a análise dos resultados obtidos. Analisa-se o desempenho do sensor para a determinação do diclofenac de sódio e são apresentados os resultados dos testes de permeação para as diferentes membranas.

Por fim, na quinta parte, expõem-se as conclusões gerais do trabalho e referem-se alguns dos possíveis desenvolvimentos futuros.

2. Revisão Bibliográfica

2.1– Diclofenac

2.1.1- Diclofenac e as suas propriedades

O diclofenac é um derivado do ácido fenilacético, sendo o resultado da modificação molecular da indometacina. É um composto que pertence a um grupo de medicamentos chamados anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs). Designa-se segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemists) como ácido 2-[(2,6-diclorofenil)amino] benzoacético sendo mais usual encontrá-lo na forma de sal de sódio ou potássio. Encontra-se na Tabela 2.1 a fórmula química e a massa molecular do composto [4,5].

Tabela 2.1 – Nome da IUPAC, fórmula química e a massa molecular do diclofenac.

Nome IUPAC:	Ácido 2-[2-(2,6-diclorofenil)amino] benzoacético
--------------------	--

Fórmula química:	$C_{14}H_{10}Cl_2NO_2$
-------------------------	------------------------

Massa Molecular:	296,14864 g/mol
-------------------------	-----------------

Neste trabalho é utilizado o diclofenac na forma de sal de sódio. A sua fórmula química é $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$, apresentando uma massa molecular de 318,14 g/mol. A sua forma estrutural está representada na Figura 2.1.

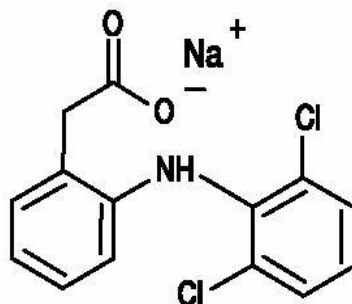


Figura 2.1 – Estrutura química do diclofenac de sódio [6].

O diclofenac de sódio é um pó cristalino, branco ou levemente amarelado, ligeiramente higroscópico, ligeiramente solúvel em água, facilmente solúvel em metanol e em álcool, e pouco solúvel em acetona. É um ácido fraco, pois a constante de dissociação (pKa) do diclofenac de sódio em água a 25°C é de $4 \pm 0,2$. O coeficiente de partição em n-octanol/água com pH 7,4 é de 13,4 e com pH 5,2 é 1,5. A solubilidade depende do pH da solução, sendo em soluções ácidas a solubilidade mais baixa que 1 mg ml^{-1} . Por outro lado, a solubilidade aumenta para um pH por volta dos 6,5. Tem um alto ponto de ebulição (280°C) e um ponto de fusão de 170-174°C [7, 5, 8,9].

2.1.2- Utilização e acção do diclofenac no organismo

O diclofenac é utilizado clinicamente desde 1975 [4] e é usado para aliviar os sintomas de dor e inflamação em diversos problemas de saúde, tais como as artrites, gota, entorses, fracturas, dores nas costas e cirurgias menores.

Para combater os sintomas de dor e de inflamação, o diclofenac bloqueia a acção de uma enzima no organismo chamada ciclo-oxigenase (COX). A ciclo-oxigenase é responsável pela conversão do ácido araquidónico em prostaglandina (Figura 2.2). As prostaglandinas são produzidas como resposta a doenças e lesões, sendo responsáveis por desencadear a dor, inchaço, febre e inflamação. Nas células do nosso organismo a ciclo-oxigenase existe pelo menos em duas isoformas: COX-1 ou constitutiva e COX-2 ou indutiva. Em que o diclofenac inibe as duas isoformas, a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e a ciclo-oxigenase-1 (COX-1), sendo a COX-2 a responsável pela inflamação e a COX-1 a enzima responsável pela mucosa gástrica, provocando danos gástrico [10,11,12].

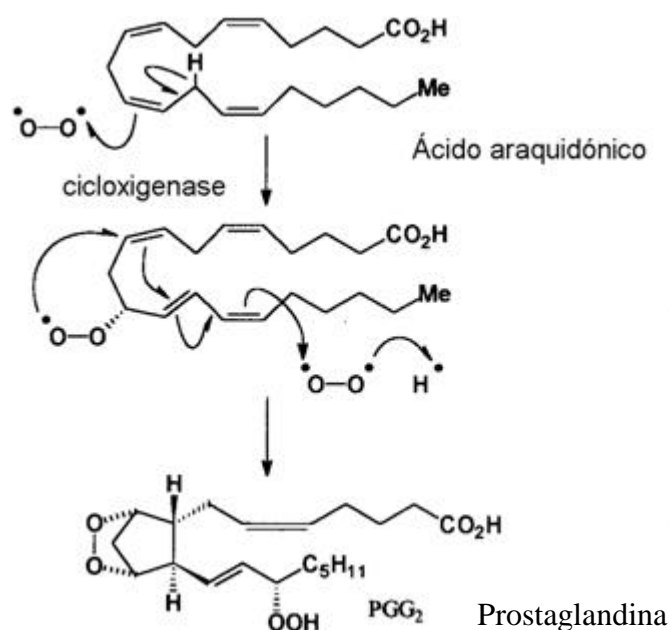


Figura 2.2 – Conversão do ácido Araquidônico em Prostaglandina [adaptado 2].

Através da administração oral, o diclofenac é completamente absorvido no trato gastrointestinal e é distribuído em maior concentração nos órgãos do fígado, rins e no sangue [5]. O composto tem um tempo de vida biológico aproximadamente de 1 a 2h no plasma sanguíneo, implicando a toma de vários comprimidos ao longo do dia para obter o efeito desejado. Apesar dos comprimidos com diclofenac de sódio serem bem tolerados e raramente provocarem graves distúrbios, podem verificar-se alguns efeitos secundários, tais como os distúrbios gastrointestinais, úlceras pépticas e hemorragias digestivas [13].

Para além da via oral, existem formulações com o diclofenac de sódio que podem ser aplicadas via transdérmica, ou seja, pela pele. Estas podem ser úteis para o tratamento de tecidos inflamados da pele, mas também para inflamações e estados dolorosos em várias partes do corpo, tais como ossos, ligamentos, articulações, tendões e músculos [12]. A permeação transdérmica é um processo complicado pois envolve vários factores, tais como a natureza da concentração dos ingredientes activos e excipientes e o tipo de método usado.

2.1.3 - Métodos de análise do diclofenac

Desde 1975, com a introdução do diclofenac no tratamento de diversas doenças, que começaram a surgir na literatura métodos de análise para a sua determinação. Mas, só desde 1987 é que foi dada uma maior atenção aos procedimentos analíticos para a determinação de formulações farmacêuticas [4].

Geralmente, há uma boa tolerância ao diclofenac, mas, por vezes, ocorrem efeitos indesejáveis que limitam a sua utilização e que resultam em custos de saúde ou até mesmo a morte [14]. Devido à necessidade de eliminar a toma de vários comprimidos e de modo a diminuir os efeitos secundários, existem tentativas de formulação para obter doses mais controladas de diclofenac.

Para testar as dosagens de diclofenac de sódio nos medicamentos existem vários métodos analíticos publicados. Alguns dos métodos utilizados na determinação do diclofenac de sódio são a Espectrofotometria Vis-UV [15, 16, 17, 18], a Espectroscopia FT-Raman [19], a Reflectometria [4], a Calorimetria [20], a Potenciometria [21, 22, 23, 24] e HPLC [25, 26]. De seguida serão descritos alguns dos métodos mencionados na literatura para a determinação do diclofenac de sódio.

Espectrofotometria UV-VIS

Alguns anos atrás, uma ou duas técnicas analíticas eram suficientes para a análise de substâncias activas, sendo a Espectrofotometria UV-VIS a técnica mais popular.

Existem algumas dificuldades na determinação directa do diclofenac devido aos interferentes que absorvem ou fluorescem na mesma região que o composto a analisar. Alguns autores determinam o diclofenac indirectamente, através da formação de complexos que absorvem na região do visível. Um dos métodos descritos na literatura baseia-se nas reacções colorogénicas como a que utiliza o Cloreto de Ferro (III) na presença de tiocianato de amónio [16], ou aquela que assenta na reacção do diclofenac de sódio com o ácido nítrico, de que resulta uma solução amarelada extractável no acetato etilo com um máximo de absorvência a 380 nm [15].

Alguns métodos permitem a determinação directa do diclofenac. Um exemplo é a combinação da espectrofotometria UV-VIS com a técnica dos mínimos quadrados parciais (PLS), onde se realiza a calibração multivariada tornando possível a quantificação dos interferentes e do composto a analisar [27].

As principais vantagens das metodologias baseadas na espectrofotometria UV-VIS são a boa precisão, sensibilidade, simplicidade, e o custo moderado do equipamento, sendo o maior problema, como já foi referido, a presença de interferentes.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A Cromatografia líquida de alta eficiência é uma forma melhorada da cromatografia de coluna. Em vez do solvente ser arrastado pela gravidade, este é forçado, pelo efeito da alta pressão, através de colunas compactas constituídas por partículas muito finas, o que torna o método mais rápido e mais eficaz.

A cromatografia líquida de alta eficiência é o método mais usado nas técnicas de separação analítica, sendo hoje em dia muito utilizada na determinação do diclofenac. A técnica assume particular importância em material biológico, com o plasma, sendo menos frequente em soro ou fluidos corporais.

As principais razões para o uso deste método devem-se à sua sensibilidade, à sua adaptabilidade e à sua aptidão para separar espécies não voláteis ou termicamente mais frágeis. [25,28].

Espectroscopia de FT-Raman

A utilização da técnica da espectroscopia de Raman tem tido um aumento contínuo como método analítico para a quantificação de misturas complexas, incluindo as preparações farmacêuticas. Esta técnica permite a análise de medicamentos, muitas vezes sem qualquer tratamento adicional. É uma ferramenta útil para a análise do produto com elevado teor do composto a analisar. Além disso, FT-Raman é uma técnica que permite a quantificação nas preparações farmacêuticas, com duas ou mais formas, no estado sólido.

Potenciometria

Recentemente, as medições potenciométricas utilizando eléctrodos selectivos de iões, têm aplicações diversas incluindo a farmacêutica. Para preparar os eléctrodos selectivos de iões para a determinação do diclofenac de sódio é usada a ciclodextrina, o brometo de hexadecilpiridínio e o mercúrio (I). Um outro método apresentado na literatura é baseado na associação do ião diclofenac com a base corante Safranine T. Este ião associado é usado como um eléctrodo de substância activa para a membrana. Geralmente são usadas membranas de PVC. [23, 24]

Reflectometria

De facto, os métodos analíticos de reflectometria na região do visível não são muito comuns, mas ultimamente têm sido publicados alguns artigos. Geralmente, apresentam uma baixa precisão e exactidão quando comparada, por exemplo, com a transmitância. No entanto, o método da reflectância apresenta algumas vantagens, sendo a mais importante a possibilidade de realizar a análise na presença de sólidos. [5].

Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

A Calorimetria Diferencial de Varrimento é a técnica termoanalítica mais utilizada para estudar e caracterizar uma ampla variedade de materiais. No entanto, apesar dos dados quantitativos (temperatura de transição, capacidade calorífica e entalpia), que podem ser obtidos, esta técnica é raramente aplicada à dosagem dos compostos principais dos medicamentos, uma vez que exige um pico calorimétrico muito bem formado, livre de interferentes [20].

O diclofenac de sódio apresenta um único processo térmico quando é aquecido até aos 250°C, em azoto. Ambas as curvas TG e DSC mostraram uma perda de massa de 100% e apenas um pico endotérmico, cuja área era proporcional à concentração do diclofenac de sódio [20].

Conclusão

Apesar da existência de várias técnicas de análise para a detecção do diclofenac de sódio alguns dos métodos mencionados anteriormente são demorados ou requerem equipamentos muito caros e sofisticados. A maioria dos métodos utilizados nos estudos de permeação não fazem leituras em tempo real, alterando assim as condições de permeação. O único método que realiza os estudos de permeação em tempo real, tal como a microbalança de cristais de quartzo é a potenciometria, tendo como principal desvantagem em relação aos sensores piezoelétricos, respostas logarítmicas e uma maior dificuldade de fabrico.

Como tal, um método baseado em ondas acústicas poderia ser uma alternativa a estes métodos, sendo a microbalança de cristais de quartzo um sensor simples, económico, versátil, sensível e com respostas em tempo real e lineares. Por estas razões referidas e por outras que serão mencionadas ao longo do trabalho o método das microbalanças de cristais de quartzo foi idealizado e desenvolvido neste presente trabalho para a realização de estudos de permeação através da pele.

2.2- Microbalança de Cristais de Quartzo

2.2.1 – Cristais piezoelétricos de quartzo

Os princípios teóricos do uso dos cristais piezoelétricos datam desde o início de 1885 por Raleigh, apesar de já ter existido uma primeira investigação em 1880 por Jacques e Pierre Curie (Curie e Curie) [29].

A piezoelectricidade descreve o fenómeno de gerar uma carga eléctrica num material quando sujeito a uma tensão mecânica ou uma pressão dinâmica, e, inversamente, uma deformação quando sujeito a um campo eléctrico [30].

Muitos tipos de cristais exibem o efeito de piezoelectricidade, mas as propriedades eléctricas, mecânicas e químicas do quartzo α fazem dele o cristal mais utilizado em aplicações analíticas. O quartzo é constituído quimicamente por dióxido de silício (SiO_2),

que é o mineral mais abundante na natureza. O cristal piezoelétrico de quartzo é obtido pelo corte num determinado ângulo na estrutura cristalina (Figura 2.3).

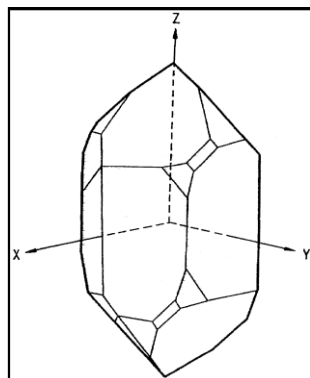


Figura 2.3 – Estrutura cristalina do cristal de quartzo com os respectivos eixos [29].

A esta fina lâmina de quartzo são aplicados dois eléctrodos metálicos, um em cada uma das faces opostas. Na Figura 2.4 pode ver-se uma representação de um cristal piezoelétrico de quartzo com eléctrodos metálicos.

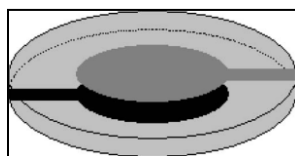


Figura 2.4 – Cristal piezoelétrico de quartzo [29].

Existem dois tipos de sensores acústicos: os BAW (“Bulk Acoustic Wave”) e os SAW (“Surface Acoustic Wave”). Normalmente os sensores do tipo BAW, operam no modo de cisalhamento TSM (“Thickness Shear Mode”).

A microbalança de cristal de quartzo (MCQ) é um dispositivo em modo de cisalhamento em que a onda acústica se propaga na direcção perpendicular à superfície do cristal [29]. Para que isto aconteça, é necessário realizar um corte com uma orientação específica, com os respectivos eixos do cristal. Os cortes específicos são AT e BT, tal

como mostra na Figura 2.5. Os cortes AT e BT tem fundamentalmente ângulos de corte de 35° e 49° em relação ao eixo do cristal primário, respectivamente. O AT a $35^\circ 15'$ é geralmente preferível, pois a frequência é praticamente insensível à variação de temperatura ambiente e é superior ao BT na sensibilidade à massa [32]. No corte AT o cristal oscila no modo de cisalhamento de espessura, em que as partículas da superfície do cristal se deslocam conforme é indicado na Figura 2.6. Se todas as variáveis que influenciam o cristal forem controladas de modo a se manterem constantes, a espessura é directamente proporcional à frequência.

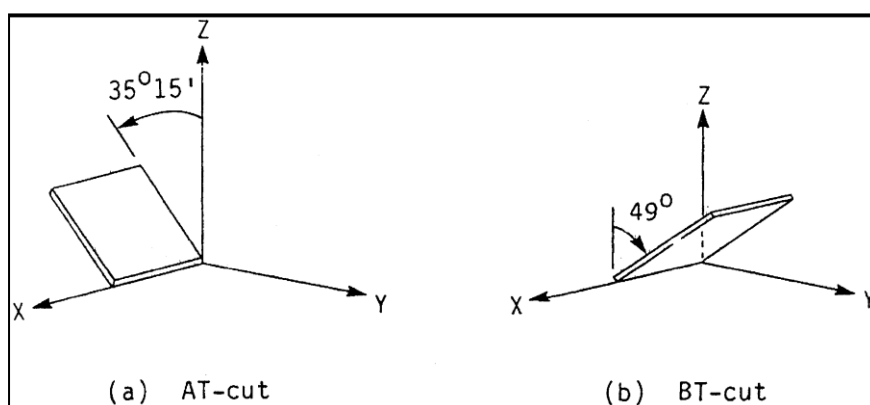


Figura 2.5 – Cortes AT-BT da estrutura cristalina de quartzo [29].

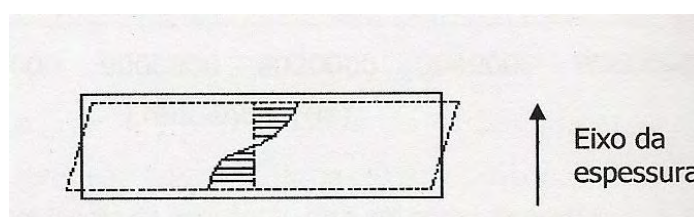


Figura 2.6 – Modo de cisalhamento da espessura [33]

A textura do cristal pode ser rugosa ou lisa, límpida ou baça. Os mais comuns são os polidos mecanicamente ou os rugosos, tendo a textura influência na aderência. Para a fase líquida é recomendado um cristal polido, isto porque o líquido pode ficar preso nas

cavidades dos cristais e por vezes pode resultar numa mudança de frequência extra. A frequência típica é fundamentalmente entre 5-10 MHz, apresentando espessuras razoáveis. Acima dos 573°C o cristal deixa de estar operável [32]. O diâmetro do cristal desempenha um papel importante na sua estabilidade, normalmente os diâmetros para os cristais de 9 MHz (os mais utilizados) são de 10 e 16 mm [35]. A espessura do cristal determina a sua frequência e por sua vez esta determina a sua sensibilidade. Quanto mais fino o cristal maior a sua frequência, maior a sua sensibilidade, tornando-se contudo os cristais muito frágeis e difíceis de manusear. Os cristais de quartzo podem ser fabricados em grandes quantidades e a baixos custos, daí o cristal de quartzo ser um termo – padrão para os microsensores.

2.2.2 – O sensor baseado em cristais piezoelétricos de quartzo

Muitos processos físicos e químicos são seguidos pela observação da diferença de massa. Neste trabalho é utilizado o método das microbalanças de cristal de quartzo, que consiste numa variação de frequência de vibração provocada por uma variação de massa.

Em 1959, Sauerbrey [29] introduziu um novo método chamado de microbalança de cristal de quartzo, através do uso de cristais piezoelétricos, em que se mede a massa de filme aderente à superfície do cristal de quartzo, por unidade de área, pela variação da frequência no cristal de quartzo ressonante. O cristal de quartzo é usado pela capacidade de ter respostas rápidas em tempo real e da sua sensibilidade que permite medições de espessuras do filme com resolução do Armstrong, sendo possível através deste método detectar uma massa de 10^{-16} kg, enquanto que com as microbalanças analíticas comerciais, apenas pode ser detectado 10^{-10} kg [31]. Logo, para medições de pequenas massas, é um instrumento bastante útil, em vácuo, gás e líquidos.

A MCQ consiste num fino disco de cristal de quartzo com dois eléctrodos, um de cada lado, de ouro ou prata. Como a MCQ é piezoelétrica, a aplicação de um potencial eléctrico externo produz um mecanismo interno de oscilação de campo eléctrico a todo o dispositivo, que induz a uma propagação de uma onda acústica através do cristal. Quando a espessura do cristal é um múltiplo de metade do comprimento de onda da onda acústica, o cristal tem uma impedância acústica mínima, tendo assim a maior eficiência [29]. Para

além da espessura existem outros factores que afectam a frequência do cristal, tais como a densidade, o corte, o diâmetro e o módulo de cisalhamento do quartzo.

Na Figura 2.7 está representado do lado esquerdo no cristal piezoeléctrico e do lado direito a resposta a uma injeção com uma determinada concentração do composto a analisar. A massa depositada na superfície do cristal provoca um aumento da espessura e, consequentemente, a frequência da oscilação diminui. Essa diminuição é proporcional à massa depositada, e se o sensor for reversível, voltará de seguida ao valor inicial. Este tipo de resposta mostra a reversibilidade do sensor, pois apenas desta forma o método analítico é viável.

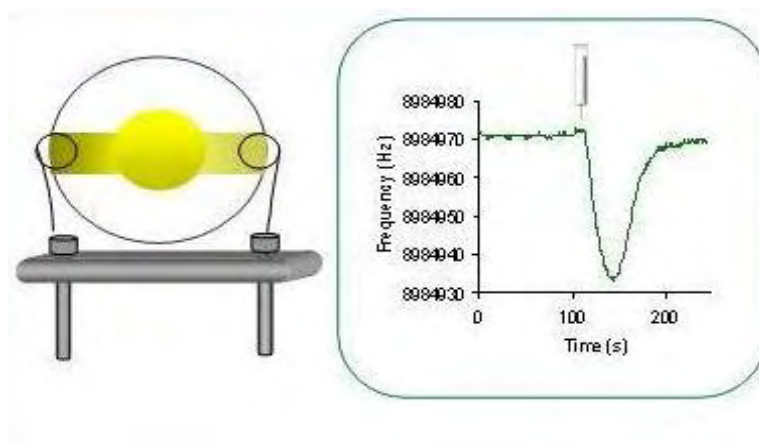


Figura 2.7 – Cristal de quartzo com eléctrodos e a resposta a uma determinada massa injectada.[34]

A variação da frequência pode ser quantificada e correlacionada com a diferença de massa usando a equação de Sauerbrey [29].

$$\Delta F = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_q \rho_q}} = -C\Delta m \quad \text{Eq. 2.1}$$

Onde ΔF é a frequência do cristal de quartzo medida (Hz), f_0^2 é a frequência ressonante fundamental (Hz), Δm é a variação de massa (g), A é a área activa de

piezoelétricidade (cm^2), μ_q é o módulo de cisalhamento do quartzo $= 2,947 \times 10^{11} \text{ g.cm}^{-2}$
 ρ_q é a densidade do cristal de quartzo $= 2,648 \text{ g.cm}^{-3}$, C é a constante da sensibilidade da massa (baseada no tipo de cristal usado) $(\text{sg})^{-1}$ [35].

A equação de Sauerbrey pressupõe uma sensibilidade uniforme na superfície activa. Logo, para que a relação seja utilizada é necessário depositar uniformemente a massa pela área activa do cristal piezoelétrico. Mas, existe um limite à quantidade de massa que pode ser depositada no cristal, deixando este de funcionar quando atingido esse limite [35].

Na maioria dos casos é utilizada a equação, mas como existem outras condicionantes que afectam a exactidão absoluta do método, tal como, a temperatura e a fixação mecânica, é necessário fazer curvas de calibração.

2.2.3 – Os sensores acústicos em líquidos

Em 1980, Konash e Bastiaans [36] fizeram a primeira tentativa de utilizar um cristal piezoelétrico de quartzo com uma fase líquida. Eles desenvolveram um detector de cromatografia líquida onde uma face do cristal é exposta a um fluxo do eluente. Embora o detector seja estável e de detecção de massa ele apresentava pouca sensibilidade e reprodutibilidade, mas demonstrou que o cristal piezoelétrico de quartzo pode produzir oscilações estáveis para os líquidos.

Inicialmente, na maior parte dos estudos, o cálculo da massa foi feito através da equação de Sauerbrey, mas esta equação é apenas aplicável para a fase gasosa. Nomura e Okuhara [37] foram os primeiros a tentar otimizar a aplicação do cristal piezoelétrico em ambientes líquidos. Estudaram as variações de frequência obtidas pela imersão de uma das faces do cristal em 17 líquidos orgânicos. Alguns anos mais tarde, Kanazawa e Gordon [38] calcularam a mudança de frequência quando uma face do cristal está em contacto com o líquido.

Quando a MCQ é usada na fase líquida a frequência é influenciada pelas propriedades do líquido. Para uma camada de espessura maior, a relação entre a frequência e a massa deixa de ser linear, tal como a equação de Sauerbrey. Quando uma das faces do cristal está em contacto com um líquido, a frequência muda drasticamente. A oscilação à superfície gera um escoamento tipo laminar no líquido, o que causa um decréscimo na

frequência proporcional a $(\rho\eta)^{1/2}$, onde ρ e η são a densidade e a viscosidade do líquido, respectivamente.

A variação da frequência do cristal em contacto com o líquido pode ser calculada pela equação de Kanasawa and Gordon (1985) [38, 31].

$$\Delta f = -f_q^{3/2} \left(\frac{\rho\eta}{\pi\rho_q\mu_q} \right)^{1/2} \quad \text{Eq. 2.2}$$

Onde ρ_q é a densidade do cristal de quartzo e μ_q é o modo de cisalhamento.

Além da viscosidade e densidade do líquido, outros grupos de pesquisa comprovaram que certos parâmetros como a estrutura da interfase sólido/solução, condutividade, polaridade, temperatura, viscosidade interfacial, características hidrofóbicas e hidrofílicas da superfície do cristal e extensão da área do cristal em contacto com a solução são de grande importância para a aplicação de cristais piezoelétricos em ambientes líquidos [39]. No caso dos líquidos, apesar do uso de cristais de quartzo AT a temperatura será um factor mais crítico, pois a viscosidade e a densidade variam significativamente com a variação de poucos graus da temperatura.

A frequência do cristal varia muito com a imersão num líquido. O cisalhamento condiciona o movimento do líquido, pois este gera uma onda que penetra no líquido, tal como está representado na Figura 2.8. Esta onda é amortecida pela energia dissipada, dependendo das características do líquido, tendo o deslocamento um máximo à superfície. O comprimento de decaimento da onda é $1\mu\text{m}$, logo é necessário $1\mu\text{m}$ para que a onda seja toda amortecida ao penetrar no líquido [40].

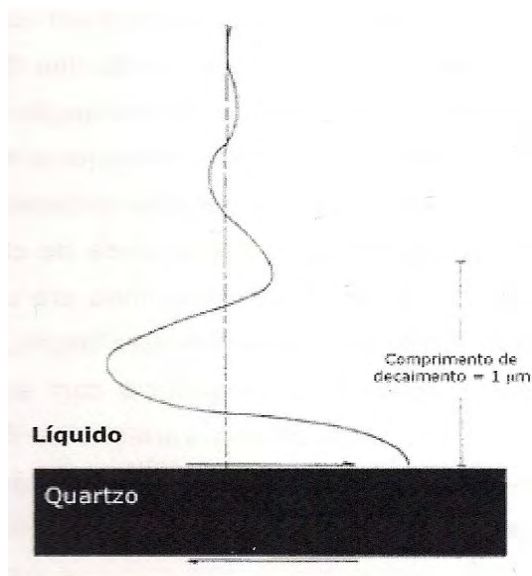


Figura 2.8 – Modo de cisalhamento para um cristal de quartzo em meio líquido [40].

A mudança de frequência não só depende da massa depositada no cristal de quartzo, mas também das interações entre o revestimento e o composto a ser analisado. Se não existir interação com os eléctrodos é necessário revestir o cristal de modo a que esse revestimento absorva ou adsorva o composto a ser analisado.

2.3– Revestimento

2.3.1 – Escolha do Revestimento

Caso a espécie a determinar não interaja com o cristal é necessário revesti-lo com um filme. O revestimento do cristal proporciona a detecção do diclofenac de sódio no líquido. Para isso, foi necessário preparar um revestimento que fosse insolúvel em água, e que interagisse com o diclofenac de sódio. Também é importante, para a escolha do revestimento, que em contacto com o analito a resposta seja rápida, a selectividade, sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade e reversibilidade sejam boas, de modo a que se possa reutilizar de novo o sensor.

Existem diferentes compostos utilizados nos sensores potenciométricos com membranas de PVC, capazes de interagir com o composto a ser analisado (diclofenac de sódio). Recentemente, a ciclodextrina, o brometo de hexadecilpiridínio e o mercúrio são os ionóforos mais usados. A ciclodextrina pode formar complexas inclusões com as moléculas orgânicas, o hexadecilpiridínio produz uma selecção de acordo com a série de Hofmeister (i.e., selectividade baseada apenas na lipofilicidade dos aniões) e o mercúrio imobiliza o ião complexo par. O mercúrio é um composto ambientalmente prejudicial e a preparação com o mercúrio é mais difícil, sendo de evitar a sua utilização [23]. Através da pesquisa bibliográfica verificou-se que seria melhor utilizar o brometo de hexadecilpiridínio, pois este apresenta uma melhor curva de calibração e também uma maior sensibilidade.

Neste trabalho foi preparado um sensor constituído por policloreto de vinilo (PVC) e brometo de hexadecilpiridínio (HDPB) que reage com o diclofenac formando um ião complexo estável insolúvel em água. A Tabela 2.2 sumariza as composições de diferentes membranas com quatro plastificantes diferentes, segundo o trabalho realizado por Shamsipur et al [22].

Tabela 2.2 – Composições de diferentes membranas com quatro plastificantes diferentes, e as suas respectivas respostas [adaptado 22].

Composição (%)				
PVC	Plastificante	HDPB	Nernstiano (mVdecada ⁻¹)	Gama de concentrações de diclofenaco com resposta linear (M)
32	NPOE,66	2	-52,5	$1,0 \times 10^{-5} - 3,0 \times 10^{-2}$
32	DPB,66	2	-59,0	$1,0 \times 10^{-5} - 1,2 \times 10^{-2}$
32	DOS,66	2	-57,0	$2,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-2}$
32	AP,66	2	-31,0	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-2}$

O uso de 66% de plastificante ftalato de dibutilo (DBP) na presença de 2% do ionóforo HDPB resulta nos melhores resultados para a sensibilidade e na melhor recta de calibração. A curva de calibração obtida com um ISE (Figura 2.9) com este revestimento mostra que a gama dinâmica linear vai de $1,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-1}$ M do diclofenac. O sensor exhibe um declive Nernstiano de -59 ± 1 mVdecada⁻¹. O limite de detecção da recta do gráfico de calibração da Figura 2.9 é de $4,0 \times 10^{-6}$ M (1,3 ppm).

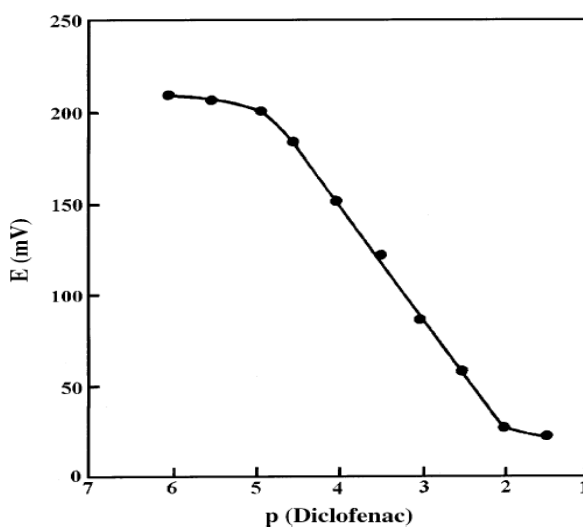


Figura 2.9 – Curva de calibração do revestimento [22].

Pode ser usado num pH entre os 6,0-9,0 (Figura 2.10), pois é nesta zona que o potencial se mantém constante.

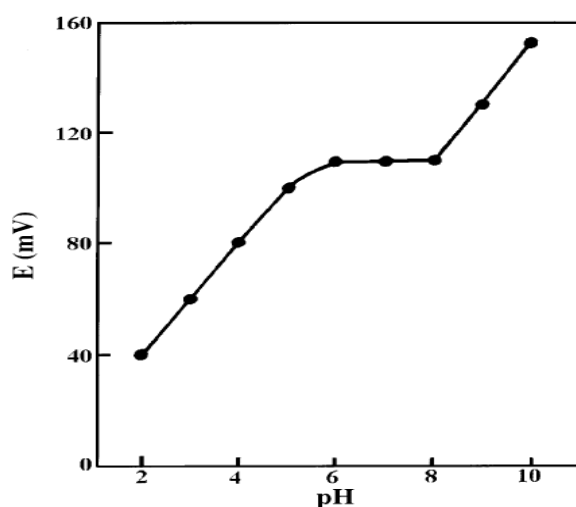


Figura 2.10 – Efeito do pH na resposta do revestimento [22].

O eléctrodo exibe uma boa selectividade para o diclofenac no que diz respeito a um número de espécies comuns de inorgânicos e orgânicos. A membrana preparada pode ser usada durante 3 meses sem nenhuma divergência no potencial [22].

Com base nestes resultados, foi seleccionado um filme com a composição anteriormente descrita para revestir o cristal piezoeléctrico. Espera-se que os sensores piezoeléctricos com este revestimento apresentam boa estabilidade e sensibilidade, e duas importantes vantagens face aos homólogos potenciométricos: maior facilidade de fabrico e respostas lineares com a concentração.

2.4– Permeabilidade da Pele

2.4.1- Pele

A pele é um órgão que reveste a superfície externa do corpo humano e tem aproximadamente $1,8 \text{ m}^2$. Ela apresenta diferentes tipos celulares na sua estrutura e desempenha diversas funções: sensoriais, de defesa, de excreção e de controlo da

temperatura. Forma uma barreira protectora das funções vitais contra a acção dos agentes físicos, químicos e bacterianos.

Microscopicamente a pele é constituída por multicamadas, mas, num corte perpendicular, visto de fora para dentro, tal como mostra a Figura 2.11, a pele apresenta três camadas: Epiderme, Derme e o Tecido Subcutâneo.

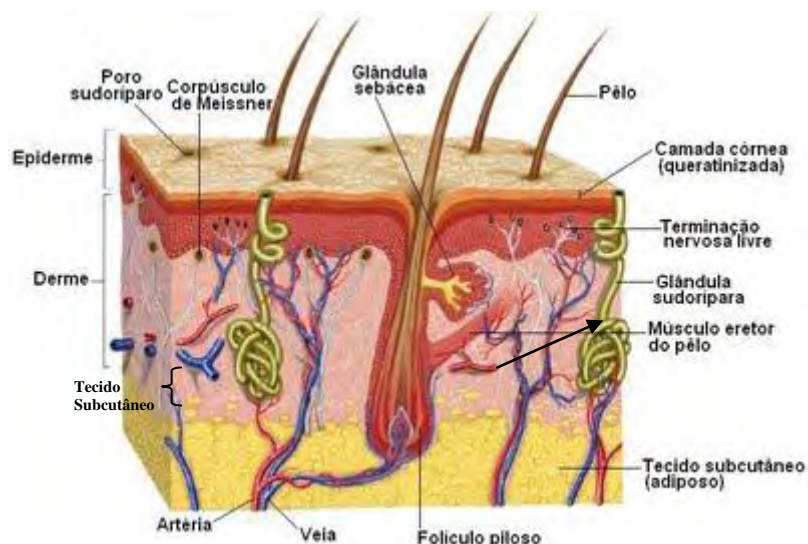


Figura 2.11 – Estrutura da pele [41].

A epiderme é constituída pela epiderme morta ou estrato córneo e também pela epiderme viva. O estrato córneo é o principal responsável pela barreira protectora da pele. É uma membrana impermeável muito resistente que protege o corpo contra as invasões externas e evita também a migração de fluidos corporais, sendo considerado um escudo mecânico e biológico entre o meio ambiente e o interior do corpo. As propriedades deste escudo mecânico e biológico estão relacionadas com o conteúdo específico e a composição dos lípidos do estrato córneo [42].

Existem dois caminhos que a pele pode utilizar para a passagem do composto, transdérmica e dérmica. A passagem transdérmica envolve a passagem percutânea do composto através da pele até à circulação sanguínea. No transporte dérmico a pele é por sua vez o órgão alvo [43].

A absorção cutânea pode ser influenciada por factores fisiológicos e físico-químicos da pele. Os factores fisiológicos da pele são o estado da pele, a idade, o local de aplicação e o metabolismo cutâneo, enquanto que os factores físico-químicos são a

hidratação cutânea, a temperatura, o princípio activo, a concentração inicial, a relação entre o coeficiente de partição/actividade termodinâmica, a viscosidade, o pH e os promotores de absorção. São poucas as substâncias que conseguem atravessar a barreira da pele para desempenhar a sua acção. Logo, os fármacos que são administrados por esta via devem ser de grande eficácia, porque as doses máximas que a pele absorve é de 10 mg/dia. Um bom fármaco também deve possuir uma massa molecular pequena, deve ter uma boa solubilidade em água e também no óleo e não ser irritante [44, 45].

A selecção do veículo do composto é um passo bastante importante que deve ser bastante analisado e pode afectar a absorção percutânea. Existem factores que contribuem para a selecção adequada dos veículos do composto para a passagem transdérmica, tais como: a solubilidade do veículo no composto, a libertação do composto do veículo para a pele, e a penetração do composto através do estrato córneo [46]. Estes passos são dependentes das propriedades físico-químicas do composto, do veículo e da barreira. Para controlar a passagem transdérmica do composto a resistência difusional dentro do veículo deve ser mais alta do que no estrato córneo [47].

2.4.2 – Difusão

A permeação de compostos através da pele deve-se à difusão pela epiderme através dos apêndices da pele como os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas. No entanto, os apêndices da pele apenas ocupam 0,1 % da pele do corpo humano, sendo a contribuição para a difusão muito pequena. A permeação do composto através da pele é usualmente limitada pelo estrato córneo [42]. Para além disso, a difusão depende da espessura e da integridade do estrato córneo que varia de espécie para espécie e também de zona para zona num mesmo indivíduo.

Existem dois caminhos na permeação do composto através do estrato córneo: o transcelular, que atravessa as células, ou o intercelular, que passa entre as células, tal como mostra a Figura 2.12. Em ambos os casos, o permeante difunde-se através da zona lipídica intercelular, sendo esta zona o determinante principal na permeação [42].

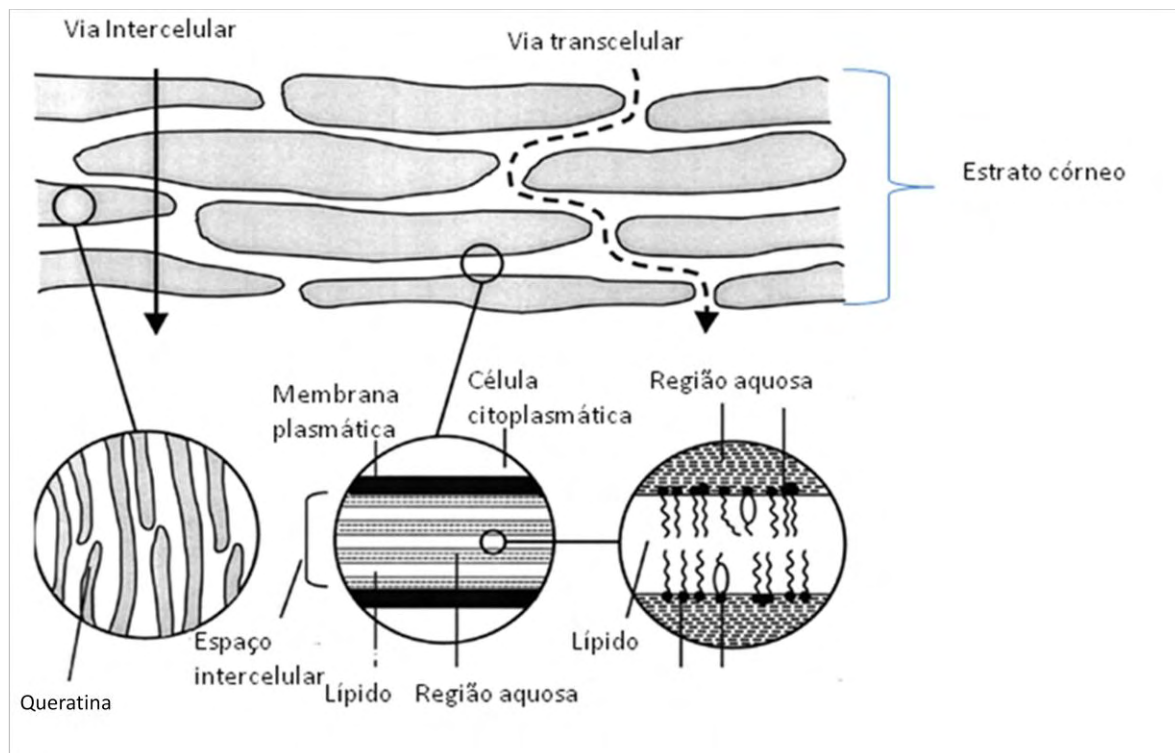


Figura 2.12 – Absorção percutânea transcelular e intercelular [adaptado de 42].

Para a realização dos estudos de difusão a maioria dos modelos matemáticos utilizados no transporte através da pele são equações a uma dimensão com condições fronteiras definidas [48].

O fluxo de uma substância por unidade de área de uma secção é proporcional ao gradiente de concentração medido perpendicularmente à secção [49], como se pode ver na seguinte equação:

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

Onde, J é o fluxo de transferência por unidade de área de uma secção, D é o coeficiente de difusão, C é a concentração da substância transferida e x é coordenada espacial na direcção da difusão.

Esta forma da 1ª lei de Fick aplica-se na ausência de convecção na direcção da difusão, o que se aplica a soluções diluídas, que a difusão seja unidireccional. A Figura 2.13 mostra o esquema ilustrativo da difusão estacionária que se estabelece através de um

filme de espessura l , colocado entre duas soluções diluídas com diferentes concentrações [50].

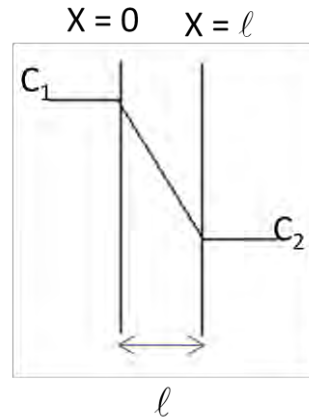


Figura 2.13 – Esquema ilustrativo da difusão estacionária através da membrana.

As superfícies da membrana são mantidas a concentrações C_1 e C_2 , respectivamente. Após algum tempo, atinge-se o estado estacionário, e a concentração é constante em todos os pontos da membrana. Essa situação pode ser traduzida [49]:

$$\frac{d^2C}{dx^2} = 0 \quad (\text{Eq. 2.4})$$

Considerando que o coeficiente de difusão D é constante e integrando em ordem a x , vem:

$$\frac{dC}{dx} = \text{constante}$$

A equação diferencial apresenta duas condições fronteiras [49,50]:

$$x = 0, \quad C = KC_1$$

$$x = l, \quad C = KC_2$$

Onde, K é o coeficiente de partição, este é uma propriedade do equilíbrio, logo o seu uso implica que o equilíbrio existe através da superfície da membrana [50].

Em estado estacionário, o fluxo da substância que permeia na membrana é igual ao longo de toda a secção, e é dado pela seguinte equação:

$$j = \frac{ADK}{l} (C_1 - C_2) \quad (\text{Eq. 2.5})$$

Sabe-se que o coeficiente de permeabilidade é o produto do coeficiente de partição (K) com o coeficiente de difusão (D). No caso de saber-se o fluxo e o gradiente de concentração, é possível determinar o coeficiente de permeabilidade (P) através da seguinte equação:

$$j = \frac{AP}{l} (C_1 - C_2) \quad (\text{Eq. 2.6})$$

O coeficiente de permeabilidade é expresso nas unidades de cm^2/s , apesar de diferentes investigadores utilizarem diferentes unidades e mesmo diferentes definições para P.

O fluxo é a quantidade de composto que permeia numa determinada área da pele num determinado período de tempo. Podendo também ser descrito da seguinte forma [48,51]:

$$j = \frac{d\left(\frac{Q}{A}\right)}{dt} = \frac{KD}{l} (C_1 - C_2) \quad (\text{Eq. 2.7})$$

Quando é aplicada uma determinada concentração de composto numa das faces da membrana, antes de atingir o estado estacionário, o fluxo e a concentração variam com o tempo em todos os pontos dentro da membrana. A quantidade de composto que difunde através da membrana num determinado tempo é dada pela seguinte equação [48,49]:

$$Q_t = K(C_1 - C_2) \frac{t}{l} + \frac{2l}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{C_1 \cos \frac{n\pi}{2} - C_2}{n^2} \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{Dn^2\pi^2 t}{l^2}\right) \right\} + \frac{4C_0 l}{\pi^2} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)^2} \{1 - \exp(-D(2m+1)^2\pi^2 t/l^2)\} \quad (\text{Eq. 2.8})$$

Inicialmente a concentração na membrana (C_0) é zero e a concentração na face na qual a substância difundida emerge (C_2) é mantida à concentração de zero. Para este caso, temos:

$$\frac{Q_t}{lC_1K} = \frac{Dt}{l^2} - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp(-Dn^2\pi^2 t/l^2) \quad (\text{Eq. 2.9})$$

Quando o t tende para tempos muito longos, o exponencial é desprezável, sendo esta zona correspondente ao estado estacionário, onde o fluxo é constante.

$$Q_t = \frac{ADKC_1}{l} \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad (\text{Eq. 2.10})$$

A recta na zona onde se verifica o estado estacionário é extrapolada para o eixo do tempo, no valor $Q_t = 0$, correspondendo esse valor ao tempo de latência (θ), sendo:

$$\theta = \frac{l^2}{6D} \quad (\text{Eq. 2.11})$$

Na Figura 2.14 representa-se uma curva típica da a quantidade permeada (Q_t) em função do tempo (t).

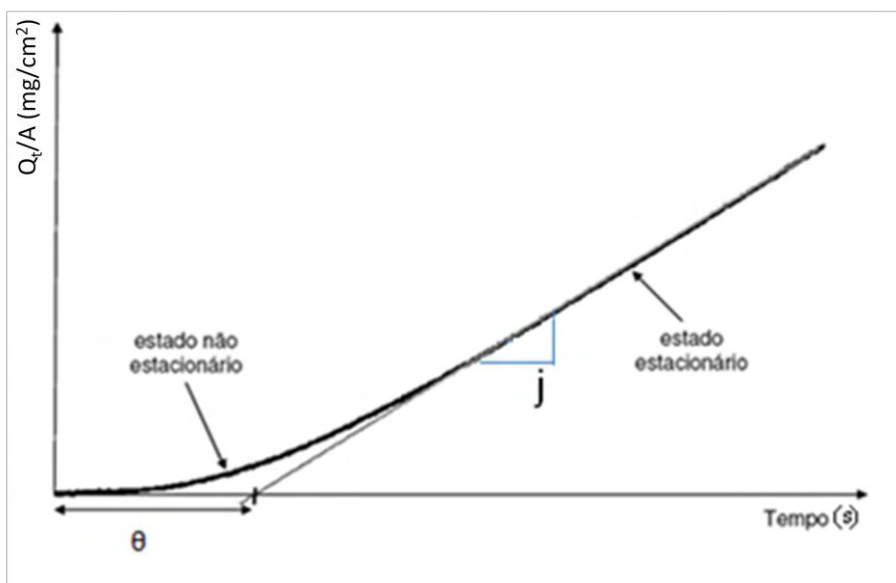


Figura 2.14 – Representação gráfica da resposta típica das permeações através de membranas [adaptado 53].

Nesta curva típica da permeação em membranas, observa-se inicialmente uma zona que corresponde ao tempo de latência (θ), sendo esta uma medida que corresponde ao tempo que demora a obter um gradiente de concentração da permeação constante através da membrana [52].

Através do gráfico da Figura 2.14 é possível determinar o tempo de latência (θ) e com a equação 2.11 retira-se o valor do coeficiente de difusão. Para além disso, também é possível determinar o fluxo (j), sendo este o declive da linha da zona estacionária.

Apesar de muitos investigadores usarem estes modelos, existem resultados para os estudos de difusão que são inconsistentes e por vezes mesmo controversos. Isto é consequência da grande variedade de métodos e sistemas de testes que se utilizam para as experiências de difusão na pele, e, por outro lado, do facto de existirem ainda questões em aberto sobre o modo de calcular e se interpretar os resultados experimentais mais complexos [51].

2.4.3 – Testes “InVitro”

O ideal para determinar a absorção percutânea dos compostos na pele era fazer um estudo nos próprios humanos. No entanto, muitos compostos são tóxicos, havendo ainda outras dificuldades com os testes em humanos, nomeadamente a dificuldade da avaliação desses testes, o custo dos mesmos, o consumo de tempo e as restrições éticas [54]

O objectivo dos testes “in vitro” é verificar o comportamento dos princípios activos do medicamento, sendo utilizada a pele de cadáveres humanos e a pele obtida após cirurgias plásticas. Como existe alguma dificuldade em arranjar pele humana, alguns investigadores substituem-na pela pele de certos animais, alguns exemplos são a pele de orelha de porco, a pele de ratos e coelho. Mas, a pele dos animais difere significativamente da pele humana, sobretudo na espessura, natureza, estrato córneo, densidade, folículos pilosos e glândulas sudoríparas. Também se substitui por vezes a pele por membranas artificiais, apesar das mesmas apenas permitirem medir quantitativamente e qualitativamente a passagem percutânea do princípio activo e não apresentarem a complexidade biológica e físico-química que tem a membrana da pele do homem [44]. Pelas razões mencionadas anteriormente, Ansari et al [54] realizaram um estudo sobre membranas naturais como a pele do pêssego, do tomate, do ovo, do celofane, da pele humana e da cebola. O objectivo desse estudo foi utilizar essas membranas naturais em alguns compostos em comparação com a pele humana e membranas artificiais, para estimar a possibilidade da sua substituição em estudos de permeação. Pelos resultados obtidos, Ansari et al [54] concluíram que as membranas naturais usadas apresentam poros e canais com propriedades hidrofílicas capazes de permear compostos de diferentes tamanhos, de maneira similar à pele humana, e por esta razão podem ser usadas em testes de difusão “in vitro”.

2.4.4 – Células de permeação

Existem alguns modelos de células utilizados para a determinação dos princípios activos, sendo o modelo mais utilizado na literatura a célula de Franz, da qual se pode ver um esquema na Figura 2.15. A célula de Franz cria as condições necessárias para simular da melhor forma a passagem percutânea do composto. Para tal é necessário controlar certos

parâmetros, tais como, a temperatura, a dose, a agitação e a natureza da membrana [3]. Na célula de Franz a membrana divide as duas câmaras apertadas contra uma anilha. Na parte superior da célula encontra-se a câmara doadora, onde o composto é depositado, e por baixo da membrana encontra-se a câmara receptora, solução na qual o composto se difunde. É uma célula encamisada na câmara receptora para que a solução se encontre a uma temperatura constante. Uma barra magnética assegura a homogeneização da solução. A célula de Franz tem uma entrada na câmara receptora que serve para retirar amostras da solução. Essas amostras são retiradas e analisadas periodicamente, sendo a aliquota retirada imediatamente substituída por igual volume da solução receptora à mesma temperatura.

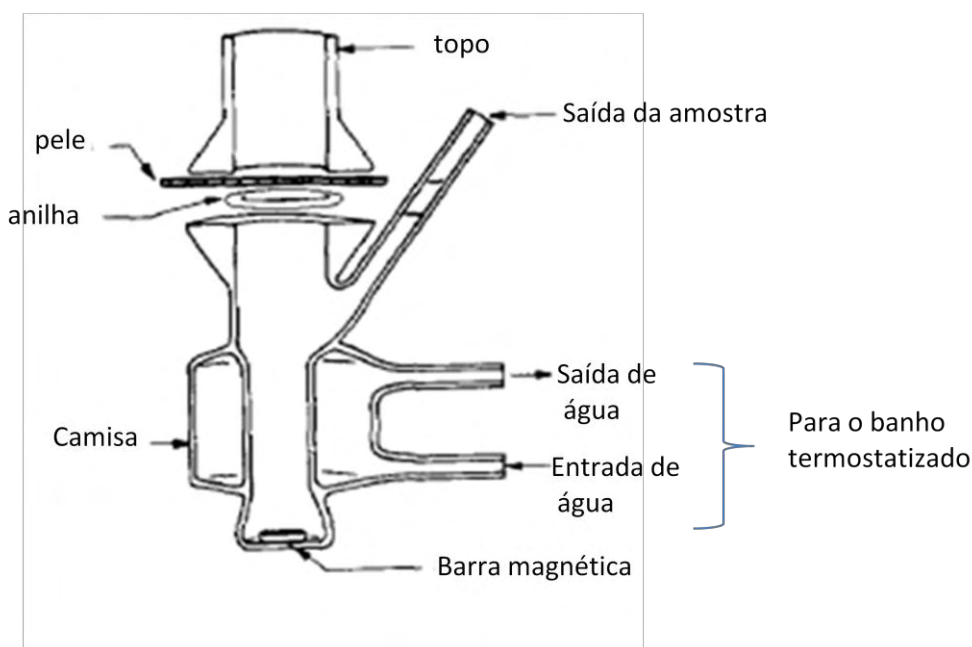


Figura 2.15 – Representação esquemática de uma célula de Franz [adaptado 3].

A temperatura utilizada nos estudos de difusão da pele é normalmente uma média da temperatura corporal e da temperatura ambiente, não existindo uma temperatura exacta, podendo ir dos 30 aos 32°C [55].

Parece-me importante que a câmara superior também possa ser termostaticável, pelo que adoptámos por um desenho diferente para a nova célula de permeação que desenhamos para este trabalho, que será apresentada na secção 3.2.

2.4.5 – Permeação do diclofenac

Pelas suas características físico-químicas, o diclofenac de sódio é um composto que apresenta dificuldades em penetrar na pele. É hidrofílico com um ponto de ebulição alto (280°C) [44]. Quanto maior for a molécula maior dificuldade apresentará na penetração da pele. Nos ácidos, a solubilidade do diclofenac é menor que 1 mg.ml⁻¹, embora aumente com o pH até cerca de 6,5. [56].

Ansari et al [54] realizou um estudo com membranas naturais e um dos compostos utilizados nesses estudos foi o diclofenac de sódio. A Figura 2.16 representa a permeação do diclofenac de sódio através de diferentes membranas: celofane, ovo, pêssgo, cebola, tomate e pele humana. Os estudos de permeação foram realizados com uma célula de Franz, com uma câmara receptora de 37 ml e 2 ml de uma solução de 10 mg/ml de diclofenac de sódio em água. Os resultados apesar de mostrarem quantidades libertadas absurdas, mostraram que a pele humana é de facto das membranas que apresenta uma menor permeação do diclofenac de sódio, quando comparada com as outras membranas estudadas.

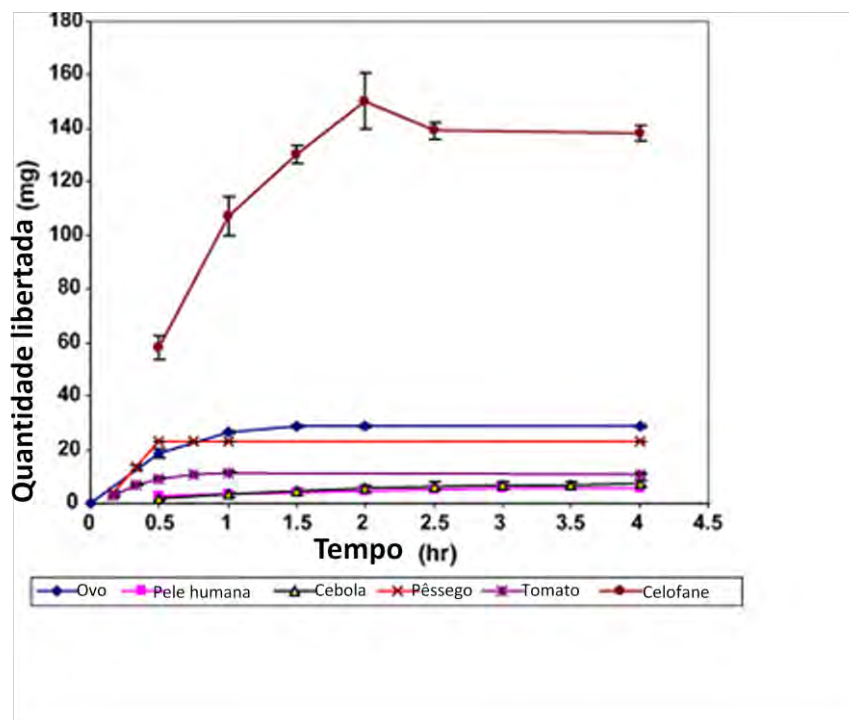


Figura 2.16 – Perfil de permeação do diclofenac de sódio através de diferentes membranas [adaptado 54].

Apesar do diclofenac de sódio não ser um bom candidato para a aplicação transdérmica, como se pode confirmar pela Figura 2.18, a permeabilidade através da pele pode ser suficientemente melhorada. Existem muitos artigos publicados que referem a realização de tentativas para aumentar a penetração do diclofenac através da pele [12,46,47,56,57]. Com esse objectivo, muitos investigadores realizam estudos em que utilizam melhoradores ou aceleradores, como por exemplo as microemulsões, terpenos, ciclodextrinas, ácidos gordos saturados e mono-insaturados, fosfolípidos e os tensioactivos não iónicos.

3. Instrumentação, Arranjo e Procedimento Experimentais

A componente laboratorial deste estudo está dividida em duas partes, a primeira parte refere-se à descrição experimental do revestimento do cristal e da montagem experimental para os testes do sensor, ao passo que na segunda parte é feita a descrição da montagem e o procedimento usado nos testes de permeabilidade.

3.1- O sensor

3.1.1 – Reagentes e Material

Os reagentes utilizados para a execução do trabalho estão descritos na Tabela 3.1. As soluções foram preparadas com água Milli-Q e os reagentes não sofreram nenhuma purificação prévia. Foi utilizado como gás de arraste o azoto Alphagaz proveniente do ArLíquido.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizados na primeira parte do procedimento experimental.

Reagentes	Referência
Diclofenac de sódio	SIGMA D6899-10G
Brometo de hexadecilpiridínio	SIGMA C5881-25G
Policloreto de vinilo (PVC) alto peso molecular	FLUKA 81392
Ftalato de dibutilo (DBP)	SIGMA-ALDRICH D2270
Tetrahidrofurano (THF)	SIGMA-ALDRICH 33709
Água Milli-Q	

3.1.2 - Revestimento do cristal

Os cristais utilizados para este trabalho são cristais de quartzo polidos e lisos de 9 MHz com corte AT, e com eléctrodos de ouro (ICM). Os cristais foram previamente lavados com THF e secos. Registou-se a frequência do cristal lavado.

Na preparação do revestimento foram utilizados os reagentes nas proporções que Shamsipur et al tinham usado na preparação das membranas para os eléctrodos selectivos [1]. A Tabela 2.2 mostra as percentagens de cada composto: 32% de PVC (policloreto de vinilo), 66% de DBP (Ftalato de dibutilo) e 2% de HDPB (Brometo de hexadecilpirídínio). Logo após a pesagem dos reagentes na microbalança (Sartorius M5P) ou medição do volume no caso dos compostos líquidos, estes foram dissolvidos em THF (tetrahidrofurano).

A aplicação do revestimento foi feita através da utilização de uma micropipeta (Figura 3.1), sendo este método utilizado para minimizar os gastos dos reagentes, uma vez que os compostos eram muito solúveis e caros. [2]

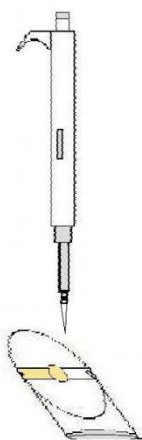


Figura 3.1 – Utilização de uma micropipeta no revestimento do cristal de quartzo.

Colocou-se uma gota do revestimento sobre os eléctrodos do cristal e deixou-se secar durante 2 dias no excicador. Ao fim deste tempo, registou-se a frequência do cristal com o revestimento.

3.1.3 - Descrição da aparelhagem e montagem experimental

Neste trabalho, para a realização dos testes com o sensor do diclofenac utilizou-se a montagem da Figura 3.2.

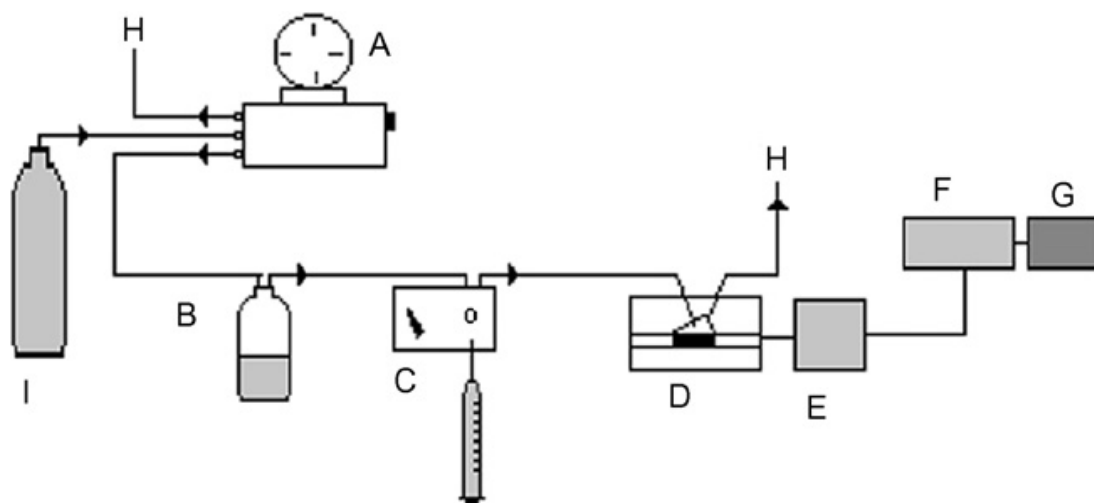


Figura 3.2 – Montagem experimental para os testes com o sensor. A) Manómetro, B) Garrafa contendo água Milli-Q, C) Válvula de injeção, D) Célula de PVC contendo o cristal piezoelétrico de quartzo, E) Oscilador, F) Frequencímetro, G) Computador; H) Esgoto, I) Garrafa de Azoto [58].

Os cristais revestidos foram colocados na célula de PVC, como se vê na Figura 3.3, entre as anilhas, ficando apenas uma das faces em contacto com o líquido e a outra em contacto com o ar, apertando a célula com os parafusos de modo a que esta não verta solução.

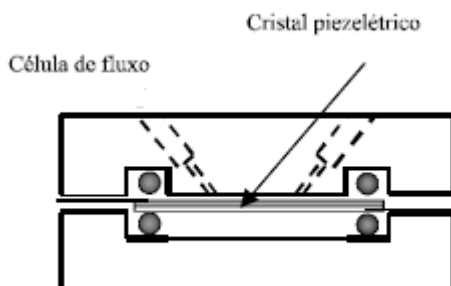


Figura 3.3 – Esquema ilustrativo da célula de PVC para o cristal piezoelétrico [adaptado de59].

A água milli-Q da garrafa foi arrastada pela pressão criada pelo azoto, de modo a percorrer todo o circuito da montagem, ou seja, passando através da válvula de injeção, seguindo para a célula de PVC onde se encontra o sensor, e, por fim, saindo pelo esgoto. O controlo do caudal da água, que é geralmente de 0,75 ml/min, foi feito através do controlo da pressão pelo manómetro (OMNIFIT).

As amostras foram injectadas na válvula de injeção (OMINIFIT 1106) com uma serpentina de 0,5 ml. Depois da solução ter passado pela serpentina e de ter percorrido o tubo de teflon, esta chegou à célula do sensor. O cristal estava ligado ao oscilador, por sua vez ligado a uma fonte de alimentação, sendo transmitido o sinal ao frequencímetro (LEADER LF827). As leituras da frequência foram registadas no computador, estando este ligado com um cabo GPIB ao frequencímetro.

3.1.4 - Procedimento

Preparam-se soluções padrão de diclofenac de sódio de diferentes concentrações. Antes da injeção da amostra, com a frequência estabilizada, registou-se o valor da frequência inicial. Injectou-se a amostra e observou-se o decréscimo da frequência, registando-se o valor da diferença de frequência obtida.

3.2- A permeação

Nesta segunda parte é apresentada a montagem e o procedimento experimental usados nos testes de permeação. Para a realização dos testes de permeação foi necessário montar e construir uma célula e acoplar um sistema de injeção do diclofenac. O sistema foi evoluindo ao longo do tempo, à medida que detectavam problemas experimentais. Alguns parâmetros como a temperatura e a agitação tiveram que ser cuidadosamente controlados.

3.2.1 – Reagentes e Material

Os reagentes utilizados neste procedimento foram os mesmos utilizados na Tabela 3.1, e, tal como anteriormente, não foi realizada nenhuma purificação prévia. Os cristais utilizados são os mesmos que os referidos na secção anterior.

As membranas utilizadas neste trabalho para os testes de permeação foram o celofane, a pele do pêssogo e do tomate. Foi utilizado um micrómetro digital (Mitutoyo) para medir a espessura de cada uma das membranas utilizadas, sendo a determinação das espessuras, no caso do pêssogo e do tomate, feita através do cálculo da média das cinco medições efectuadas em zonas diferentes da pele. A Tabela 3.3 representa as espessuras medidas das membranas utilizadas neste trabalho experimental.

Tabela 3.2 – Espessuras das respectivas membranas do celofane, pêssogo e tomate.

Membranas	Espessuras (mm)
Celofane	0,023
Pêssogo	0,043±0,002
Tomate	0,039±0,004

3.2.2 - Célula de Difusão

Neste trabalho é utilizado como método de análise a microbalança de cristais de quartzo piezoeléctricos sendo necessário criar uma célula de difusão capaz de operar com este método. Normalmente é utilizada para os estudos de permeação da pele a célula de Franz, como já foi referido anteriormente. Contudo, esta célula apresenta várias limitações para a utilização das microbalanças de cristais de quartzo.

A célula de Franz encontra-se normalmente na vertical e a agitação da solução é realizada através da barra magnética que se encontra no fundo da parte receptora, como se vê na Figura 2.15 da secção anterior. Deste modo o sensor piezoeléctrico não teria espaço para ser colocado na célula de difusão e além disso não poderia existir agitação caso o sensor fosse colocado de tal forma. Para resolver esta questão, mandou-se construir uma célula posicionada na horizontal e colocaram-se umas concavidades para as barras

magnéticas na parte lateral da célula, em ambas as câmaras, de modo a que a solução seja sempre homogeneizada, para que a temperatura das soluções seja homogénea e seja facilitada a difusão. Um dos pontos fracos detectados na célula de Franz apresentada na Figura 2.15 é que a célula está apenas termostaticada na câmara receptora. Então, para que as soluções em ambas as câmaras sejam termostaticadas, a nova célula foi mandada construir com ambas as câmaras encamisadas, incluindo a zona onde se coloca a membrana. Para além disso, havendo a necessidade de eliminar tanto quanto possível as bolhas de ar dentro da célula, colocaram-se duas aberturas em cada uma das câmaras. Através das Figuras 3.4 e 3.5 é possível observar os dois compartimentos separados, estando colocada na câmara receptora a célula do sensor piezoelétrico.

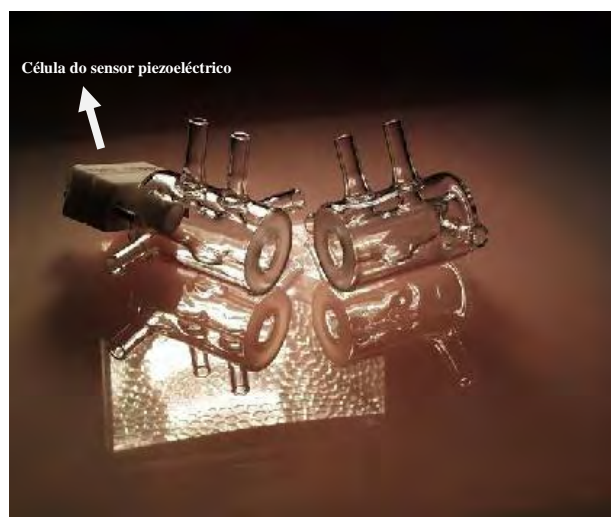


Figura 3.4 – Célula de Franz modificada na horizontal com sensor piezoelétrico.

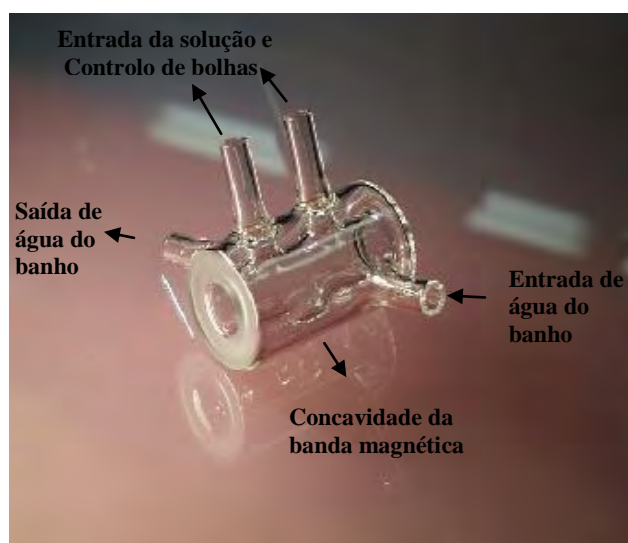
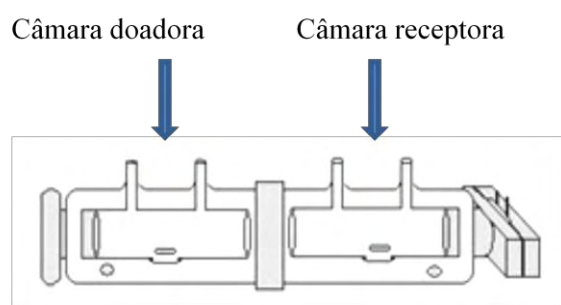


Figura 3.5 – Câmara doadora da Célula de Franz modificada.

3.2.3 – Montagem da célula de difusão

A Figura 3.6 mostra o esquema e a imagem da célula de difusão montada com o sensor piezoelétrico.



a)



b)

Figura 3.6 – Representação da célula de difusão com o sensor piezoelétrico: a) esquema, b) imagem vista por cima.

A célula de difusão utilizada neste trabalho foi uma célula em vidro posicionada na horizontal como mostra a Figura 3.6, com uma área difusional de $1,35 \text{ cm}^2$, com duas câmaras, a receptora e a doadora. A câmara doadora e receptora têm uma capacidade de 8 e 9ml, respectivamente.

Entre a câmara doadora e receptora foi colocada a membrana para a realização dos testes de permeação. Durante o decorrer do trabalho houve alguns cuidados a ter com a célula de difusão, isto porque existiram alguns problemas na montagem da célula e também pela frequente ocorrência de ruído que interferia na frequência. Inicialmente, as duas câmaras apenas se juntavam uma à outra com a ajuda do suporte metálico, que está representado na Figura 3.6 b). Um dos problemas foi resolvido pela colocação de uma anilha, entre as duas câmaras, que impedirá que a solução vertesse. Também foram colocadas duas barras magnéticas maiores do que as iniciais, em cada câmara, para ajudar a uma boa homogenização da solução. O ruído foi difícil de eliminar, e por vezes mesmo impossível, porque nem sempre se conseguia determinar as causas.

O revestimento do cristal foi efectuado segundo a descrição da secção 3.1.2. O cristal piezoeléctrico depois de revestido foi colocado numa célula de PVC, e esta, foi acoplada na câmara receptora da célula de difusão.

3.2.4 – Requisitos experimentais e alterações à montagem inicial

Ao longo do trabalho foram surgindo algumas dificuldades em obter a montagem adequada para conseguir obter os resultados pretendidos, sendo necessário durante o decorrer do trabalho ir alterando a instrumentação. De facto, a célula de permeação foi construída com o propósito de se utilizar num banho termostaticado, à semelhança do que acontece com a célula de Franz. No entanto, com a utilização do banho termostaticado não era possível controlar com muito rigor a temperatura, pois os motores inicialmente usados para a agitação geraram uma grande quantidade de calor, ainda havia o receio das perdas de calor na passagem da água do banho até à célula. A temperatura é de facto um factor bastante crítico no caso de líquidos, e basta uma variação de poucos graus para haver variações significativas na frequência e na permeação. Variações na temperatura provocam problemas de estabilização da frequência que varia porque a densidade e viscosidade das

soluções variam com a temperatura. Também as propriedades dos compostos do revestimento dependem da temperatura e variam com a mesma. Decidiu-se por isso substituir o banho termostatzado por uma estufa com aquecimento e arrefecimento, esperando conseguir um maior controlo da temperatura. Apesar da mudança para a estufa verificou-se que a frequência aumentava continuamente. De facto, os agitadores libertavam uma tão grande quantidade de calor que se tornava difícil a estabilização da temperatura. A fim de eliminar este problema, trocou-se de agitadores.

Para além da estabilização da frequência, houve a necessidade de resolver o problema das injeções na célula, pois inicialmente estas eram feitas manualmente, o que não era possível sem abrir a estufa. Para resolver isso mudou-se da injeção manual para uma bureta automática. Depois de algumas alterações e resoluções de alguns problemas, a aparelhagem final utilizada nos testes de permeação foi a que está esquematizada na Figura 3.7.

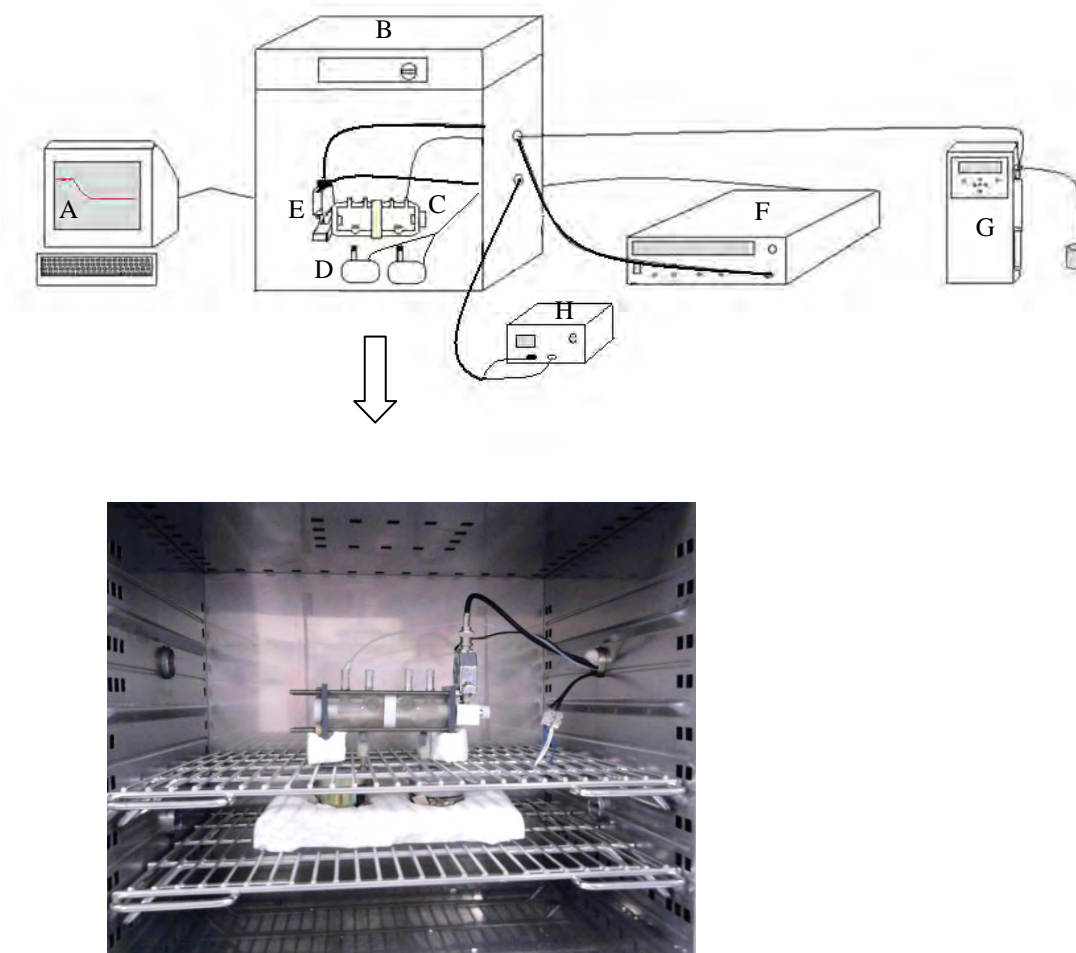


Figura 3.7 – Montagem experimental para os testes de permeação: A) computador, B) Estufa, C) célula de difusão com o sensor piezoelétrico, D) agitadores, E) oscilador, F) frequêncimetro, G) bureta automática, H) fonte de alimentação.

A célula de difusão foi colocada dentro da estufa (FRIOCELL) e os agitadores foram posicionados de modo a conseguirem realizar uma boa agitação da solução, com velocidades de agitação entre 60 e 70 rpm. O trabalho foi realizado à temperatura de 32°C, programando-se a estufa (FRIOCELL), de modo a que a temperatura seja constante ao longo de todo o trabalho. Foi colocada uma película de Parafilme nas entradas da célula de difusão para que a solução não evaporasse.

O sensor piezoelétrico foi ligado ao oscilador, que por sua vez está ligado ao frequêncimetro (LEADER LF827). O computador recebeu a informação do frequêncimetro

e registou em tempo real a variação da frequência. A bureta automática (CRISON BURETTE 1S) com uma seringa de 10 ml foi ligada à câmara doadora da célula para se poderem efectuar as injeções das soluções padrão do diclofenac de sódio.

3.2.5 – Procedimento

Preparou-se uma solução de 8000 ppm de diclofenac de sódio num balão de 20 ml e encheu-se a seringa da bureta automática com a solução preparada. A quantidade da seringa (10 ml) é suficiente para várias injeções da calibração e mesmo da permeação.

Calibração

Preparou-se a célula de difusão sem a membrana a separar as câmaras, encheu-se a célula com (8+9) ml de água Milli-Q. Colocou-se a célula de difusão dentro da estufa, como mostra a Figura 3.7, introduziu-se o tubo que liga a bureta automática na primeira entrada da câmara doadora e taparam-se as quatro entradas das câmaras com Parafilme (para não haver evaporação da solução que está dentro da célula de difusão). Ajustou-se a célula dentro da estufa de modo a que os agitadores conseguissem que as barras magnéticas realizassem uma boa agitação dentro da célula. Este trabalho, realizou-se na sua maioria com a velocidade de agitação de 70 rpm, sendo utilizado a velocidade de 60 rpm apenas na membrana de celofane, para testar a influência da velocidade de agitação nos testes de permeação. Programou-se a estufa (FRIOCELL) para a temperatura de 32°C e iniciou-se o programa LabView 5.1 para aquisição dos dados da frequência no computador. Depois da frequência estabilizada fizeram-se injeções sucessivas de 40 µl ou 80 µl da solução de 8000 ppm de diclofenac de sódio, consoante o volume injectado na experiência de permeação (150µL ou 225µL). Registou-se o decréscimo da frequência provocado pela injeção de diclofenac e após a estabilização da frequência, repetiu-se a injeção pelo menos mais cinco vezes, de modo a obter uns 6 a 7 pontos na recta de calibração.

Permeação

A célula de difusão foi preparada com a membrana do celofane, de seguida encheu-se a câmara da parte doadora com 8 ml e na parte receptora com 9 ml de água Milli-Q. Inicialmente foram injectadas na célula de difusão um volume pré-estabelecido da solução de 8000 ppm de diclofenac de sódio, sendo a velocidade de agitação de 60 e 70 rpm. No momento da injeção foi registado o tempo e a frequência, e observou-se o seu decréscimo até à sua estabilização. Após a estabilização retirou-se a célula da estufa, desmontou-se a célula de difusão e lavou-se muito bem com água Milli-Q (inclusive o cristal de quartzo). Secou-se a célula de difusão e montou-se de novo a célula para nova experiência.

4. Resultados e discussão

4.1 – Testes ao sensor

Neste trabalho foi testado um revestimento constituído por PVC com um ionóforo de HDPB e um plastificante DBP (como está descrito na secção 2.3.1). Para a detecção do diclofenac de sódio foi necessário fazer testes ao sensor para verificar o seu funcionamento visto que não existe na literatura nenhum estudo anterior do uso de microbalanças de cristais de quartzo para a detecção de diclofenac de sódio. Para isso foi utilizada uma montagem de injeção em fluxo onde passa água Milli-Q, como descrito na secção 3.1.3, e injectaram-se soluções padrão de diclofenac de sódio. A Figura 3.1 representa a resposta a uma injeção da solução padrão de diclofenac de sódio de 200 ppm.

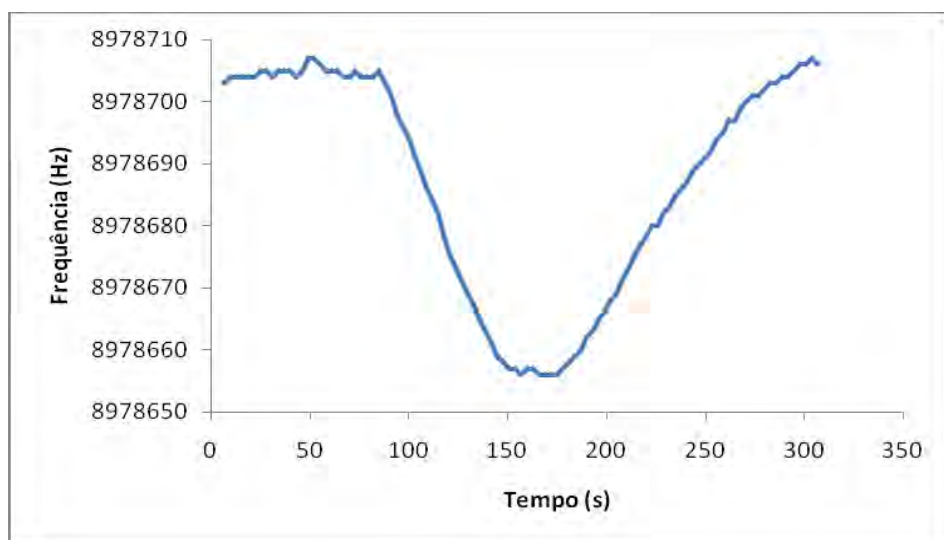
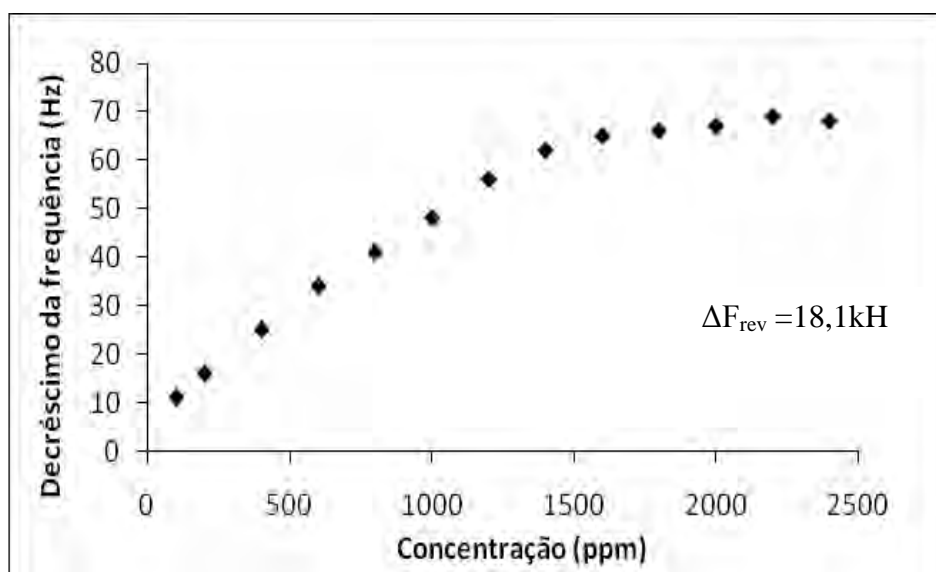


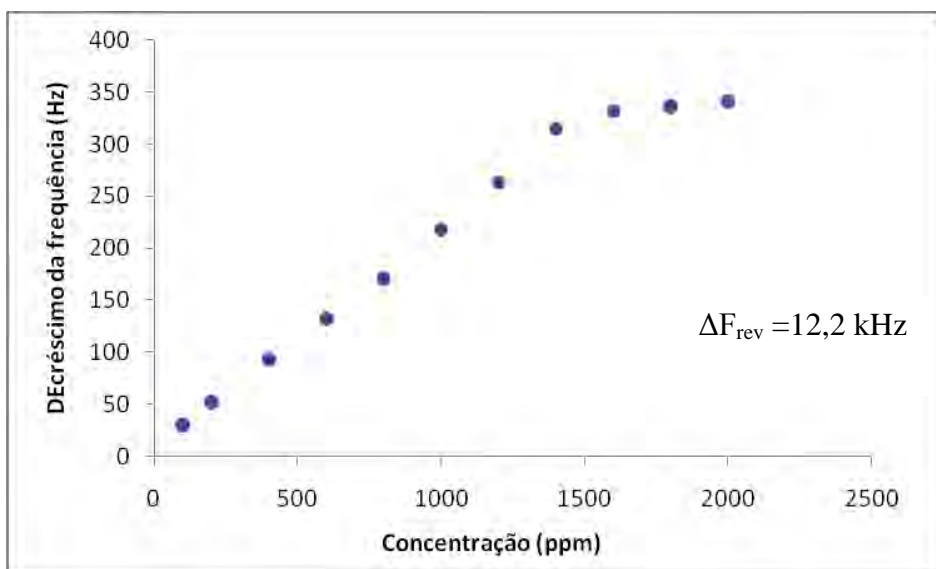
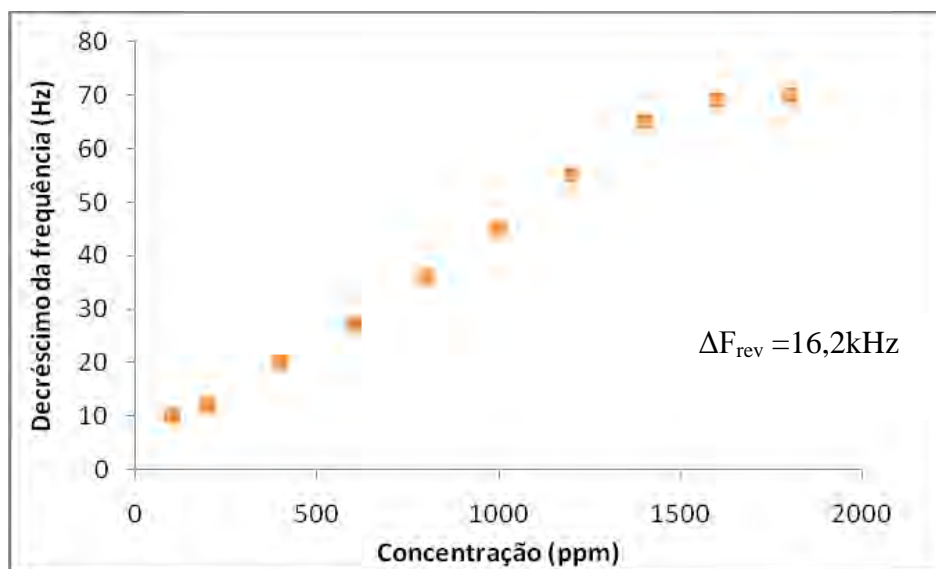
Figura 4.1 – Gráfico da resposta a uma injeção da solução padrão de diclofenac de sódio.

Pela observação do gráfico da Figura 4.1 verificou-se que após a injeção ocorreu um pequeno pico de pressão, mas logo de seguida observou-se um decréscimo da frequência. Este decréscimo da frequência deve-se ao facto de a massa sobre o cristal

aumentar com a interacção com o diclofenac e da frequência ser inversamente proporcional à massa. Com a passagem de água pelo sensor, dá-se a dessorção do diclofenac, o que provoca uma subida da frequência. A reversibilidade da interacção entre o diclofenac e o revestimento permite que este seja reutilizável e viável. O comportamento do sensor é semelhante em todas as injeções das soluções padrão, em que apenas difere a variação da frequência, o que está relacionado com as diferentes concentrações das soluções padrão.

De modo a testar a sensibilidade do sensor, foram analisadas as respostas para os revestimentos com variações de frequências de 18,1kHz, 16,2kHz, 12,2 kHz e 11,6 kHz. Os revestimentos dos cristais foram feitos tal como está descrito na secção 3.1.2, e o teste ao sensor consistiu na injeção de várias amostras padrão na válvula de injeção, com uma serpentina de 0,5 mL. Na Figura 4.2 estão representadas as curvas de calibração para os revestimentos de 18,1kHz, 16,2kHz, 12,2 kHz e 11,6kHz.





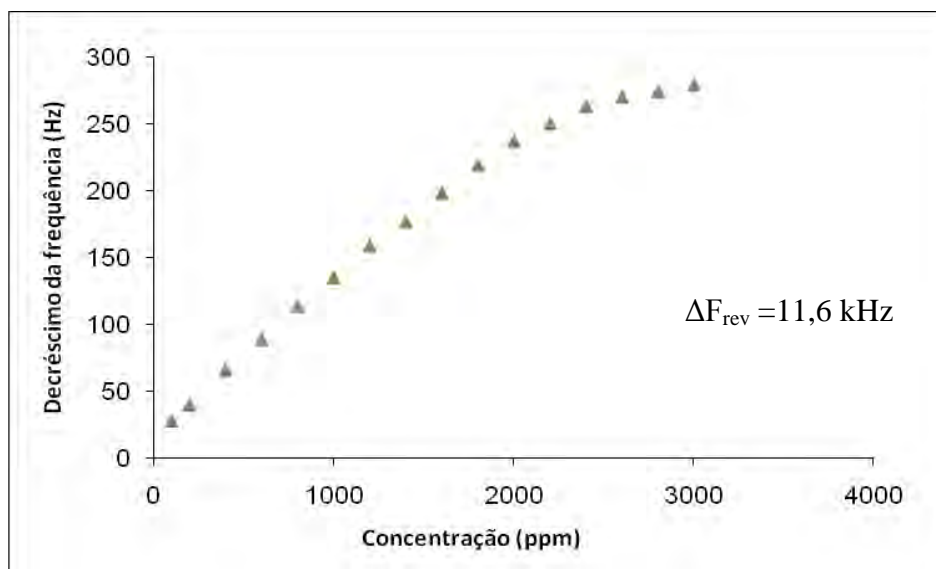


Figura 4.2 – Gráficos das curvas de calibração obtidos com cristais com diferentes quantidades de revestimento.

Pela sua observação verificou-se que todos os cristais revestidos responderam às injeções das soluções padrão de diclofenac de sódio. O decréscimo da frequência aumentou com a concentração até se verificar uma estabilização para concentrações elevadas.

De modo a comparar os diferentes revestimentos, representaram-se na Figura 4.3 as rectas de calibração para os cristais revestidos com quantidades que produziram decréscimos de frequência de 18,1, 16,2, 12,2 e 11,6 kHz.

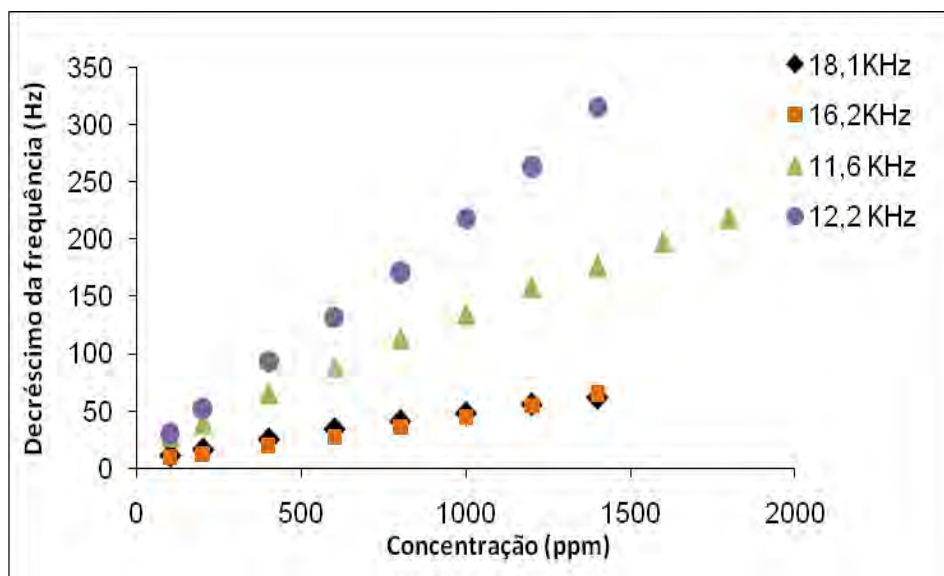


Figura 4.3 – Gráfico das rectas de calibração para os revestimentos de 18,1, 16,2,12,2 e 11,6 kHz.

Pela análise do gráfico anterior verificou-se que os revestimentos de 18,1 e 16,2 kHz apresentaram respostas muito próximas, tendo o decréscimo de frequência aumentado em ambos com a concentração até atingir a estabilidade, sendo a maior resposta aproximadamente de 69Hz. Relativamente ao revestimento de 12,2 kHz, verificou-se que comparando com os outros dois revestimentos, este apresenta decréscimos de frequências muito superiores, para as mesmas concentrações de diclofenac, sendo a maior resposta de 341 Hz. Apesar da quantidade de revestimento neste sensor com decréscimos de frequência de 12,2 kHz ser inferior aos que apresentam 18,1 e 16,2 kHz, o sensor apresenta uma maior sensibilidade. Testou-se ainda um sensor com um revestimento de 11,6 kHz e verificou-se que o decréscimo da frequência foi inferior para as mesmas concentrações. Desta forma, observou-se que o revestimento mais sensível foi o de 12,2 kHz, e que um sensor com uma variação de frequência superior a esta variação não apresentou um aumento da sua sensibilidade. Este facto deve-se, provavelmente, à forma como os compostos estão posicionados na superfície do cristal e à facilidade com que o diclofenac acede aos locais activos do mesmo.

A Tabela 4.1 apresenta o declive e a ordenada na origem das rectas do gráfico anterior, bem como os respectivos coeficientes de correlações.

Tabela 4.1 – Declive, ordenada na origem e o respectivo coeficiente de correlação para cada revestimento.

Revestimento (kHz)	Declive	Ordenada na origem	Coeficiente de correlação
18,1	$0,0390 \pm 0,0001$	$8,7 \pm 0,1$	0,996
16,2	$0,043 \pm 0,003$	$3,4 \pm 3,3$	0,994
12,2	$0,22 \pm 0,09$	$5,8 \pm 7,7$	0,998
11,6	$0,110 \pm 0,002$	$20,2 \pm 2,4$	0,998

Relativamente à Tabela 4.1 observou-se, como era esperado, um maior declive e coeficiente de correlação para o revestimento de 12,2 kHz.

Todas estas experiências foram realizadas com uma serpentina da porta de injeção de 0,5 mL. Resolveu-se testar também uma serpentina de 1mL para tentar aumentar as respostas. A Figura 4.4 apresenta graficamente as curvas de calibração para os resultados com as duas serpentinhas e a comparação das respectivas rectas de calibração.

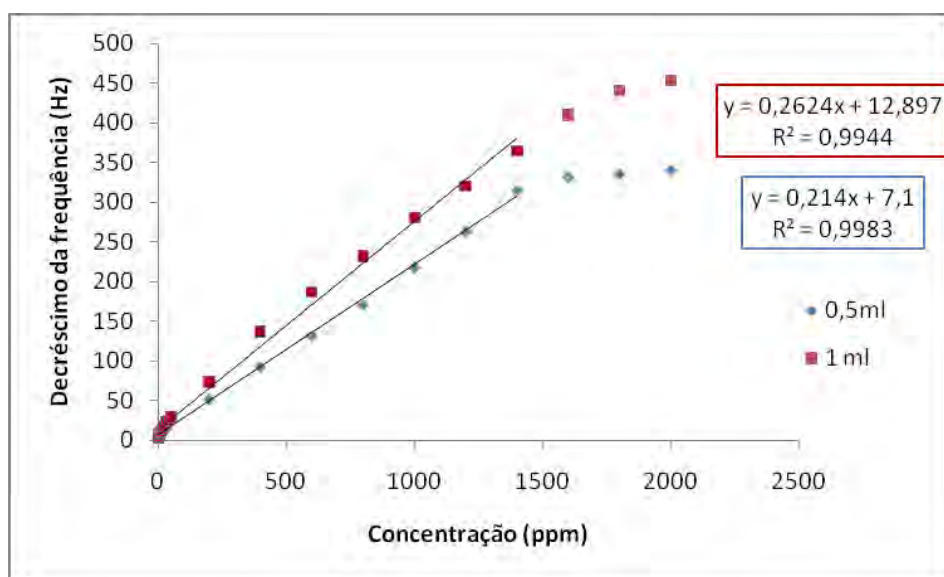


Figura 4.4 – Gráfico das curvas de calibração para as serpentinhas de 0,5 e 1mL.

Pela análise da Figura 4.4 verificou-se que as respostas são diferentes consoante a serpentina utilizada.

A Tabela 4.2 representa o declive e a ordenada na origem das rectas do gráfico anterior, bem como os respectivos coeficientes de correlações.

Tabela 4.2 – Declive, ordenada na origem e o respectivo coeficiente de correlação para cada serpentina.

Serpentina (ml)	Declive	Ordenada na origem	Coefficiente de correlação
0,5	$0,210 \pm 0,005$	$7,1 \pm 2,9$	0,998
1	$0,26 \pm 0,01$	$12,9 \pm 5,7$	0,994

Verifica-se que há vantagens em utilizar a serpentina de 1mL, uma vez que tanto as respostas e a sensibilidade aumentaram.

4.2 – Testes de permeação

Os testes de permeação baseiam-se em estudos “in vitro” em que são efectuados estudos de difusão, que permitem determinar o coeficiente de difusão e o fluxo, pelo modelo do “time-lag”.

Na realização dos testes de permeação foram utilizados três tipos de membranas: o celofane, pêssego e o tomate.

Para a membrana do celofane foram feitas experiências com duas concentrações de diclofenac na câmara doadora (147,1 e 219,1 ppm) e com a solução de 147,1 ppm foram testadas duas velocidades de agitação (60 e 70 rpm).

Apresentam-se de seguida de forma detalhada os resultados e cálculos relativos à membrana de celofane, com 150 µL de diclofenac na câmara doadora e agitação de 60 rpm.

Antes de colocar a membrana na célula foi realizada uma calibração, com cerca de 6 a 7 pontos. A célula de difusão foi montada de acordo com descrição na secção 3.2.5, tendo neste caso sido feitas 7 injeções sucessivas de 40 µL de uma solução de 8000 ppm de diclofenac de sódio.

A Figura 4.5 representa o gráfico da variação da frequência em função do tempo durante a calibração. As setas indicam o momento da injeção de 40 μL da solução de 8000 ppm de diclofenac de sódio.

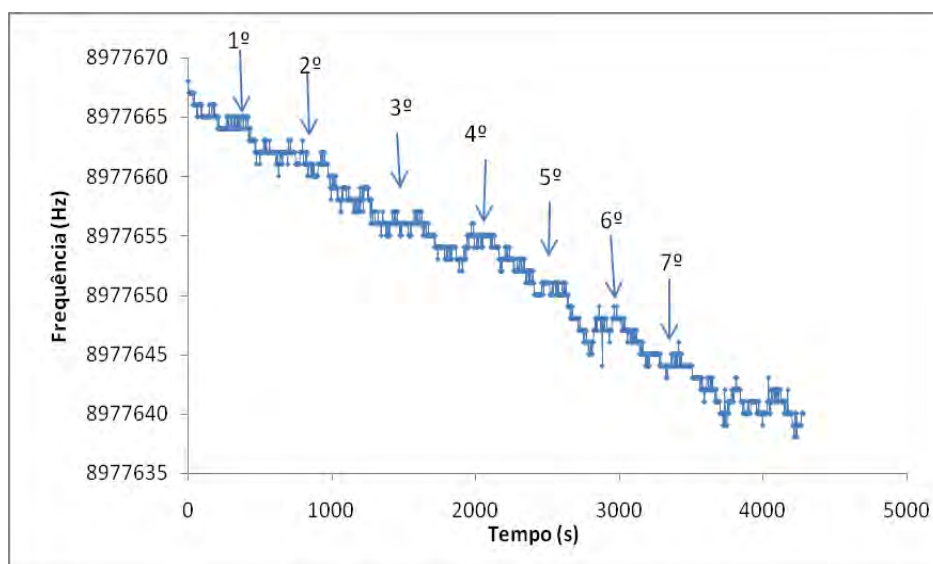


Figura 4.5 – Frequência em função do tempo, ao longo da calibração.

A Tabela 4.3 apresenta os valores da frequência obtidos antes e depois de cada injeção, bem como o volume total acumulado, a variação total da frequência e a concentração do diclofenac na câmara receptora.

Tabela 4.3 – Valores obtidos da concentração e da variação da frequência para a calibração da membrana do celofane.

$V_{\text{acumulado}}$	C (ppm)	F_i	F_f	$\Delta F_{\text{acumulado}}$
40×10^{-6}	18,79	8977665	8977660	5
80×10^{-6}	37,58	8977661	8977655	11
120×10^{-6}	56,37	8977656	8977652	15
160×10^{-6}	75,16	8977655	8977650	20
200×10^{-6}	93,96	8977651	8977645	26
240×10^{-6}	112,75	8977648	8977643	31
280×10^{-6}	131,54	8977645	8977639	37

A partir dos valores da tabela anterior, representou-se graficamente a variação da frequência acumulada em função da concentração obtendo-se assim a recta de calibração que se pode ver no gráfico da Figura 4.6.

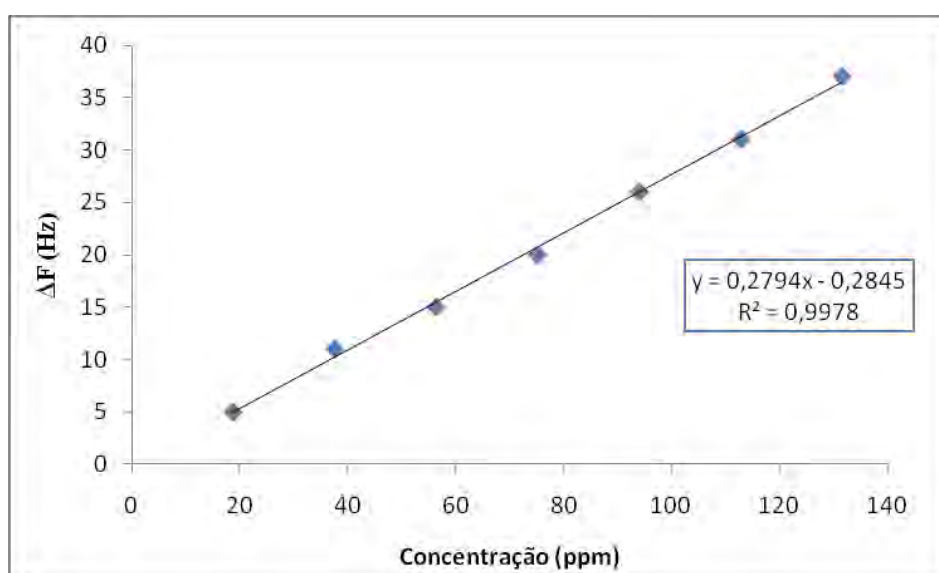


Figura 4.6 – Recta de calibração para a membrana do celofane.

Após a calibração do sensor procedeu-se à montagem da célula de permeação com a membrana de celofane e realizou-se o estudo da permeação do diclofenac de sódio.

O gráfico da Figura 4.7 representa a resposta do sensor ao longo da permeação após se terem injectado na câmara doadora 150 μL da solução de 8000 ppm com diclofenac de sódio.

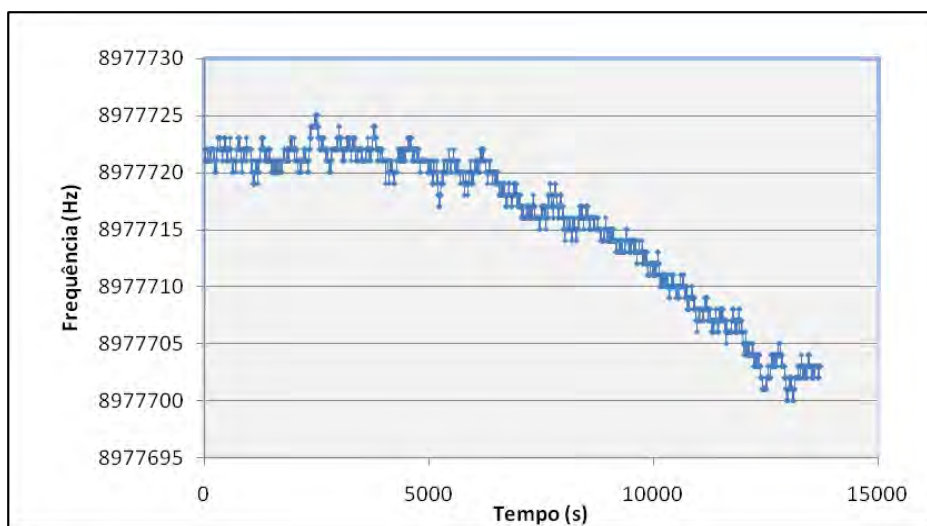


Figura 4.7 – Gráfico da resposta do sensor ao longo da permeação através da membrana do celofane.

Observando o gráfico verificou-se que ao fim de algum tempo a frequência começa a diminuir até atingir de novo a estabilidade. Através dos valores da frequência obtidos durante a permeação (Figura 4.7), e com a utilização da equação da recta de calibração, é possível obter o gráfico da Figura 4.8 que representa a concentração do diclofenac de sódio em função do tempo na câmara receptora da célula.

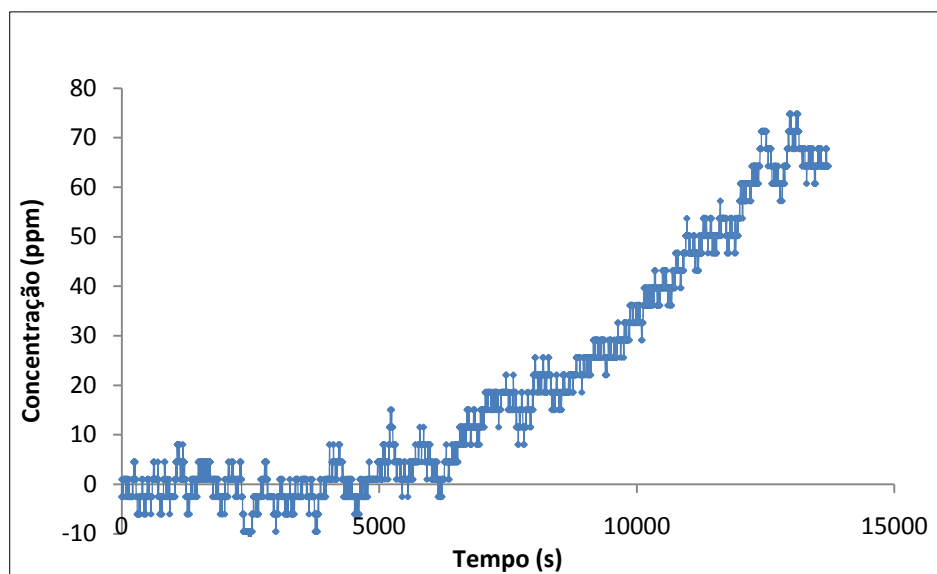


Figura 4.8 – Gráfico da concentração em função do tempo para a permeação da membrana de celofane com uma agitação de 60 rpm.

Através da observação do gráfico da Figura 4.8, verifica-se que durante o período de latência a concentração da solução receptora variou muito pouco. Posteriormente o fluxo do diclofenac através da membrana aumenta gradualmente até atingir o estado estacionário, zona onde a concentração na câmara receptora aumenta linearmente com o tempo. Após esse período atinge-se a concentração de equilíbrio.

Com os valores obtidos da concentração, calculou-se a quantidade permeada (Q_t), que se dividiu pela área da membrana (A). Representou-se graficamente (Q_t/A) em função do tempo, como se pode ver na Figura 4.9.

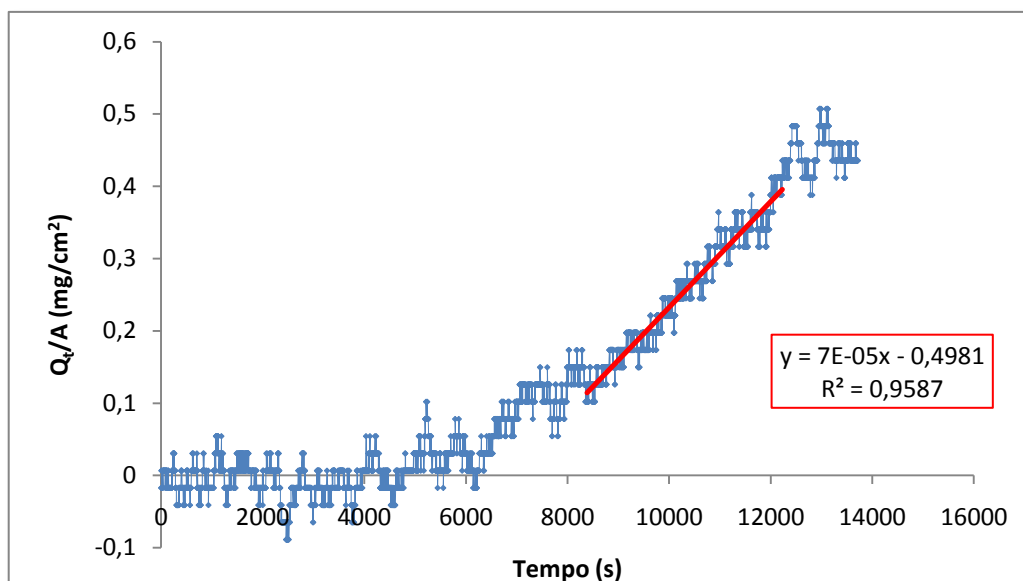


Figura 4.9 – Gráfico da quantidade permeada em função do tempo.

Através da recta traçada na zona onde o fluxo é constante, é possível utilizar o método do “time-lag” e obter o valor para o coeficiente de difusão.

O tempo de latência foi determinado pela extrapolação da recta da Figura 4.9, para o valor $Q_t = 0$. Para a determinação do coeficiente de difusão foi utilizada a equação 2.11 da secção 2.4.2 e o fluxo foi determinado através do declive da recta na zona estacionária.

Na Tabela 4.4 encontram-se os valores obtidos para o tempo de latência, os coeficientes de difusão na membrana do celofane com as velocidades de agitação de 60 e 70 rpm, quando a concentração inicial na câmara doadora era de 147,1 ppm.

Tabela 4.4 - Valores obtidos para o tempo de latência e para os coeficientes de difusão para a membrana de celofane, com as velocidades de agitação de 60 e 70 rpm.

Velocidade de agitação (rpm)	θ (s)	D ($10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$)
60	6815	$1,29 \pm 0,09$
70	2997	$2,9 \pm 0,8$

Os valores obtidos na tabela anterior mostraram que com o aumento da velocidade de agitação o coeficiente de difusão aumenta, que é uma consequência obtida da diminuição do tempo de latência. Posteriormente passou a utilizar-se a velocidade de agitação de 70 rpm em todas as experiências.

A fim de verificar a não dependência do coeficiente de difusão com a concentração do diclofenac de sódio. Repetiram-se as experiências com uma concentração maior de diclofenac de sódio na câmara doadora (219,1 ppm). Calcularam-se também o fluxo para ambas as concentrações e comparou-se a influência da concentração.

A Tabela 4.5 mostra os resultados obtidos para as duas concentrações utilizando a membrana de celofane, para a velocidade de agitação de 70 rpm.

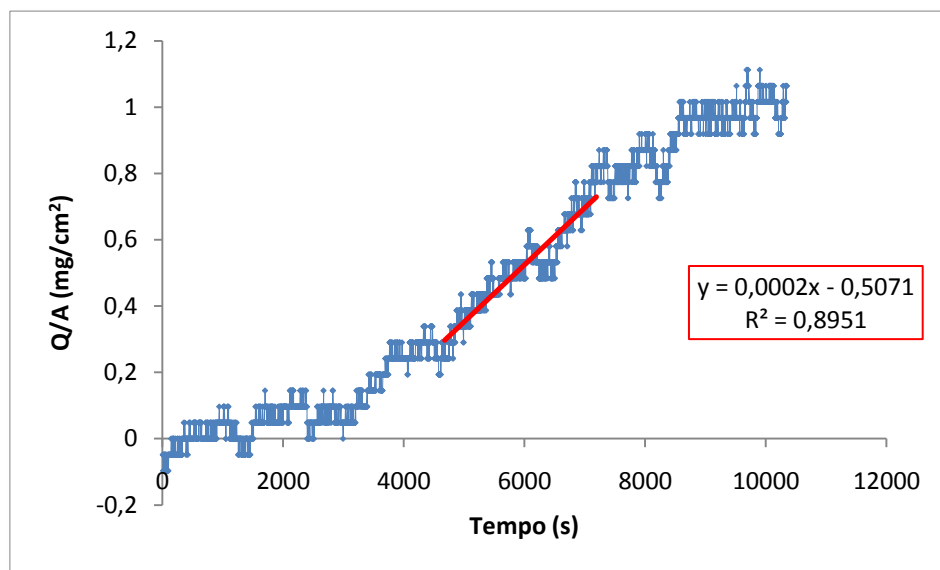
Tabela 4.5 – Tempo de latência, coeficiente de difusão e fluxo de 147,1 ppm e 219,1 ppm na câmara doadora utilizando a membrana de celofane.

Concentração injectada (ppm)					
147,1			219,1		
$\theta(s)$	$D (10^{-10} \text{ cm}^2/s)$	$J (10^{-4} \text{ mg/cm}^2.s)$	$\theta(s)$	$D (10^{-10} \text{ cm}^2/s)$	$J (10^{-4} \text{ mg/cm}^2.s)$
3136	$2,8 \pm 0,6$	$0,60 \pm 0,02$	2818	$3,1 \pm 0,4$	$3,00 \pm 0,01$
3211	$2,8 \pm 1,0$	$0,400 \pm 0,004$	2945	$3,0 \pm 0,5$	$2,0 \pm 0,16$
2997	$2,9 \pm 0,8$	$0,50 \pm 0,01$	2933	$3,0 \pm 0,8$	$1,00 \pm 0,05$
3080	$2,9 \pm 1,1$	$0,70 \pm 0,01$	3267	$2,7 \pm 0,6$	$1,00 \pm 0,02$

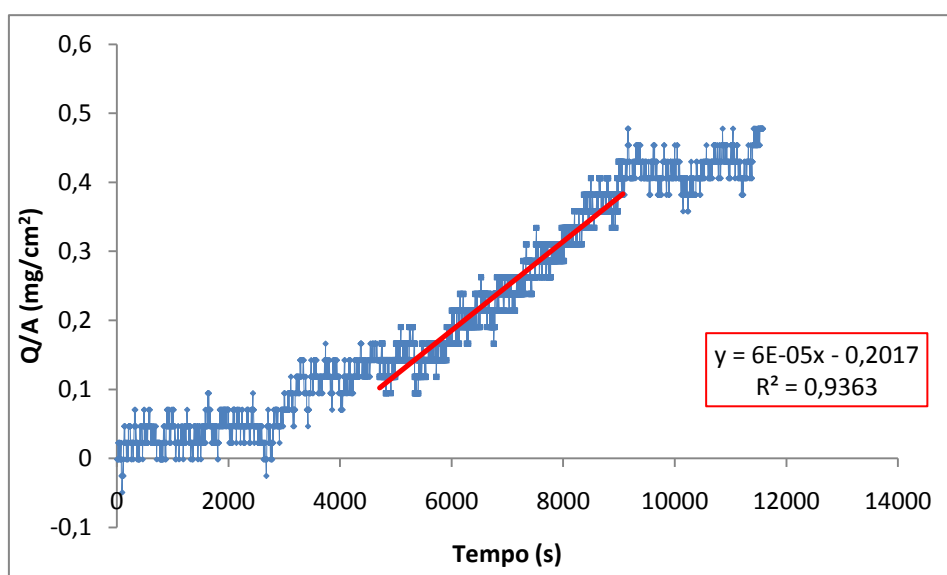
Pela observação dos valores obtidos na tabela anterior verifica-se que o coeficiente de difusão para ambas as concentrações injectadas se encontram próximos. Realizando o teste t verifica-se que não existem diferenças significativas entre eles ($\alpha=0,05$). Mostra-se que de facto o coeficiente de difusão é independente da concentração, tal como era de prever.

Comparando os valores obtidos do fluxo verifica-se que o este é maior para a concentração maior. Isto explica-se pela 1ª lei de Fick, onde se verifica que o fluxo aumenta directamente com o gradiente das concentrações.

Na Figura 4.10 (a) e (b) estão representados Q_t/A vs tempo para as concentrações da câmara doadora de 147,1 ppm e 219,1 ppm, respectivamente.



a)



b)

Figura 4.10 – Gráficos da permeação na membrana do celofane para as concentrações na câmara doadora de: a) 147,1 ppm e b) 219,1 ppm.

Comparando os gráficos (a) e (b) verifica-se que os tempos de latência são muito próximos. O fluxo é diferente, mas o tempo em que se atinge o equilíbrio é curiosamente

muito semelhante. Já a quantidade total permeada é, como não poderia deixar de ser, muito diferente.

Posteriormente foram testadas as membranas do pêssego e do tomate com a concentração de 147,1 ppm na câmara doadora. A Tabela 4.6 representa a concentração de equilíbrio e massa total permeada (m_{total}) nas membranas do celofane, pêssego e tomate, para a velocidade de agitação de 70 rpm.

Tabela 4.6 – Valores obtidos para a Concentração de equilíbrio e massa total permeada para cada membrana.

Membrana	C câmara doadora (ppm)	C_{equilíbrio} (ppm)	m_{total} (µg)
Celofane (0,023 mm)	147,1	66,94	602
Pêssego (0,043 mm)	147,1	44,02	396
Tomate (0,039 mm)	147,1	34,79	313

Pela análise dos valores obtidos das tabelas anteriores verificou-se que o celofane é a membrana que deixa permear maior quantidade de diclofenac de sódio, sendo também a membrana mais fina. Apesar da espessura das membranas ter influência na permeação, as propriedades e a constituição da própria membrana são as principais barreiras à permeação.

A Tabela 4.7 apresenta os valores do tempo de latência, do coeficiente de difusão e do fluxo, para a velocidade de agitação de 70 rpm obtidos para cada membrana.

Tabela 4.7 – Valores obtidos para o tempo de latência, do coeficiente de difusão e do fluxo para cada membrana com uma velocidade de agitação de 70 rpm.

Membrana	θ (s)	D (10⁻¹⁰ cm²/s)	J (10⁻⁴ mg/L.s)
Celofane (0,023 mm)	2997	2,9 ± 0,6	0,50 ± 0,01
Pêssego (0,043 mm)	5339	5,8 ± 0,6	0,60 ± 0,02
Tomate (0,039 mm)	3321	7,6 ± 0,5	2,0 ± 1,4

Examinando a tabela anterior, verifica-se que o coeficiente de difusão é superior na membrana do tomate, seguido do pêssego e por último a do celofane. Isto explica-se, pelo facto de cada membrana ter espessuras e constituições diferentes, obtendo-se assim valores do coeficiente de difusão e de fluxos distintos.

Apesar de na literatura se encontrarem valores para o fluxo para as membranas do celofane, pêssego e tomate, não é possível compara-las, pois a velocidade de agitação e as soluções preparadas neste trabalho apresentam condições diferentes. No entanto, sabe-se pela literatura que o valor do coeficiente de difusão para o estrato córneo de espessura de 10 μm , se situa entre o intervalo de 10^{-9} a 10^{-12} cm^2/s . Deste modo, pode-se dizer que os valores obtidos estão dentro do intervalo de valores para a pele humana e que se trata por isso de membranas modelo adequadas para os estudos de permeação, sendo os valores obtidos na ordem do 10^{-10} cm^2/s .

Em termos de quantidades permeadas, e comparando com os valores da literatura, pode-se dizer-se que Ansari et al [54] verificaram que, tal como neste trabalho, o celofane tinha uma permeação superior, seguindo do pêssego e por último do tomate.

5. Conclusões

Na primeira parte do trabalho foram realizados testes ao sensor desenvolvido para o diclofenac de sódio. Foram analisados sensores com quatro quantidades diferentes de revestimento, com a serpentina na porta de injeccção de 0,5 ml, sendo possível detectar o diclofenac de sódio com todos os cristais revestidos. Concluiu-se que o sensor mais sensível era aquele que tinha uma quantidade de revestimento que produziu um decréscimo de 12,2 kHz, e que para quantidades de revestimento superiores não produziram maiores respostas. Já a quantidade injectada influencia a grandeza da resposta e a sensibilidade, tendo-se conseguido melhores respostas com a serpentina de 1mL do que com de 0,5 mL.

Apesar das dificuldades encontradas ao longo de todo o trabalho, o objectivo principal do trabalho foi conseguido. De facto, é possível utilizar o método das microbalanças de cristais de quartzo nos testes de permeação.

Foram realizados estudos em membranas de celofane utilizando duas velocidades de agitação diferentes (60 e 70 rpm), e também se efectuou a permeação com a membrana do pêssogo e do tomate com a agitação de 70 rpm. Relativamente à agitação, constata-se que utilizando uma velocidade de agitação superior a resposta se torna mais rápida, diminuindo o tempo de latência e aumentando o coeficiente de difusão, tendo-se obtido um coeficiente de difusão de $1,29 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $2,94 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ para as velocidades de agitação de 60 rpm e 70 rpm, respectivamente. Variando a concentração inicial na câmara doadora, concluiu-se ainda que o coeficiente de difusão é independente da concentração e que o fluxo aumenta directamente com a mesma.

Quanto à permeação com as diferentes membranas, concluiu-se que o celofane tem uma permeação superior ao do pêssogo e do tomate, tendo permeado 45,4% da massa injectada na câmara doadora, enquanto que com a pele do pêssogo permearam 29,9% e com a pele do tomate apenas 23,6%. Foi determinado o coeficiente de difusão e o fluxo para as permeações realizadas neste trabalho experimental, sendo os valores dos coeficientes de difusão para o celofane, pêssogo e tomate de $2,9 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $5,8 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $7,6 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, respectivamente. Relativamente aos valores obtidos para o fluxo, o celofane e o pêssogo apresentam valores de $0,50 \times 10^{-4} \text{ mg/L.s}$ e $0,60 \times 10^{-4} \text{ mg/L.s}$, respectivamente. No tomate o valor obtido do fluxo foi de $2,0 \times 10^{-4} \text{ mg/L.s}$. No entanto, não é possível comparar os dados obtidos com os da literatura, pois a agitação utilizada e

as concentrações das soluções na câmara doadora têm condições diferentes das encontradas na literatura. Os estudos encontrados na literatura referem valores do coeficiente de difusão no intervalo de 10^{-9} a 10^{-12} cm^2/s [47], quando se utiliza pele humana com um estrato córneo de 10 μm de espessura. Para as membranas do celofane, pêssego e tomate o coeficiente de difusão está dentro do intervalo de valores para a pele humana, com coeficientes de difusão na ordem dos 10^{-10} cm^2/s . Assim, podemos concluir que as membranas do celofane, pêssego e tomate têm coeficientes de difusão no mesmo intervalo de grandeza que a pele humana.

Nos métodos utilizados na literatura para os testes de permeação, os estudos de difusão são realizados pela recolha de amostras através da célula de difusão e a sua substituição pela solução receptora à mesma temperatura, o que se traduz necessariamente na alteração das condições de permeação. Com a utilização das microbalanças de cristais de quartzo as leituras são realizadas em tempo real, não alterando o sistema e mantendo as condições de permeação, fazendo uma leitura mais próxima da realidade. Para além disso, este método tem a vantagem de ser económico, simples e versátil, sendo reutilizável e adaptando-se aos objectivos pretendidos. Contudo, como qualquer método apresenta algumas desvantagens, sendo uma delas a extrema sensibilidade a variações de temperatura, variando mesmo com a variação de décimas de grau, e a interferência por parte de outros aparelhos eléctricos próximos, ou mesmo de cabos que possam servir de antena e capturarem frequências de outras proveniências. Na verdade, o ruído é o principal problema, sendo muitas vezes difícil de eliminar por não se conseguir identificar a origem.

O revestimento escolhido para este trabalho mostrou-se não ser o mais indicado para este tipo de testes, pelo facto de o cristal não vibrar em contacto uma solução salina de fosfato de pH de 7,4. Para além de se substituir a água Milli-Q pela solução tampão salina fosfato com pH de 7,4, poder-se-ia ainda realizar estudos de permeação com a pele humana ou mesmo com outro tipo de membranas que se utilizam normalmente neste género de estudos, como a pele de animais.

Este sistema pode ser aplicado a outros fármacos, já que este tipo de sensores permitem adaptar-se às condições pretendidas, escolhendo-se para tal um revestimento que interaja com o composto que se pretende analisar.

6.Bibliografia

- [1] M. Souza, M. Ferrão, *Aplicações da espectroscopia no infravermelho no controle de qualidade de medicamentos contendo diclofenac de potássio. Parte I: Dosagem por regressão*, Rev. Bras. Cienc. Farm. 42 (2006) 3
- [2] Gomes, M. T. S. R., Bulk Acoustic Wave Sensors in Chemical Analysis em *Smart Sensors and MEMS*, editado por Sergey Y. Yurish e Maria Teresa Gomes, Kluwer Academic Publishers, Dordrech: 2004, pág.421-445
- [3] T.J. Franz, *Percutaneous absorption-on the relevance of in vitro data*, J. Invest. Dermatol. 64 (1975) 190–195
- [4] M. Tubino, R. L. d. Souza, *Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations by diffuse reflectance photometry*, Talanta 68 (2005) 776-780
- [5] R.L.Souza, *Análise quantitativa de diclofenaco em preparações farmacêuticas*, Departamento de química analítica, Universidade Estadual de Campinas, 2004
- [6]<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/image.cfm?archiveid=2374&type=img&name=diclofenacsodiumophthalmicsolution-01.jpg>
(Consultado 07/09/09)
- [7] C.M.Adeyeye, *Diclofenac Sodium, Analytical Profiles of Drug Substances* 19 (1990) 123-144
- [8] M.E. Palomo, M. P. Ballesteros., P. Frutos, *Analysis of diclofenac sodium and derivatives*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 21 (1999) 83-94

- [9] http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0506/diclofenac/diclofenac_ficheiros/page0001.htm
(Consultado em 2/12/08)
- [10] http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-0942002000400014.
(Consultado em 02/11/08)
- [11] W. H. Chahade, R. D. N. Giorgi, J. C. M. Szajubok, *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, Einstein 6 (Supl 1) (2008) S166-S74
- [12] E. Escribano, A. C. Calpena., J. Queralt, R. Obach, J. Doménech, *Assessment of diclofenac permeation with different formulations: anti-inflammatory study of a selected formula*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 19 (2003) 203-210
- [13] R. Roskar, V. Kmetec, *Liquid chromatographic determination of diclofenac in human synovial fluid*, Journal of Chromatography B 788 (2002) 57-64
- [14] M. Brunner, P. Dehghanyar, B. Seigfried, W. Martin, G. Menke & M. Muller, *Favourable dermal penetration of diclofenac after administration to the skin using a novel spray gel formulaton*, British Journal of Clinical Pharmacology (2005) 573-577
- [15] A.A.Matin, M. A. Farajzadeh, A. Jouyban, *A simple spectrophotometric method for determination of sodium diclofenac in pharmaceutical formulations*, IL FARMACO 60 (2005) 855-858
- [16] S. Agatonović-Kustrin, L. Zivanovic. c., M. Zecević, D. Radulović, *Spectrophotometric study of diclofenac Fe(III) compex*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 16 (1997) 147-153

- [17] J. C. Botello, G. P. Caballero., *Spectrophotometric determination of diclofenac sodium with methylene blue*, Talanta 42 (1995) 105-108
- [18] R. Bucci, A. D. Magrì, A.L. Magrì, *Determination of diclofenac salts in pharmaceutical formulations*, Fresenius J. Anal. Chem. 362 (1998) 577-582
- [19] S. Mazurek, R. Szostak., *Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 40 (2006) 1235-1242
- [20] R. Bucci, A. D. Magrì and A. L. Magrì, *DSC IN THE CHEMICAL ANALYSIS OF DRUGS: Determination of diclofenac in pharmaceutical formulations*, Journal of Thermal Analysis and Calorimetry 61 (2000) 369-376
- [21] A.O. Santini, H. R. Pezza., L. Pezza, *Determination of diclofenac in pharmaceutical preparations using a potentiometric sensor immobilized in a graphite matrix*, Talanta, 68 (2006) 636-642
- [22] M. Shamsipur, F. Jalali., S. Ershad, *Preparation of a diclofenac potentiometric sensor and its application to pharmaceutical analysis and to drug recovery from biological fluids*, Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis 37 (2005) 943-947
- [23] R. Maleki, A. A. Matin., R. Hosseinzadeh, A. Jouyban, *PVC membrane sensor for diclofenac: applications in pharmaceutical analysis and drug binding studies*, Pharmazie 62 (2007) 672-677
- [24] Z. Kormosh, I. Hunka., Y. Bazel, *Potentiometric determination of diclofenac in pharmaceutical formulation by membrane based on ion associate with base dye*, Chinese Chemical Letters 18 (2007) 1103-1106

- [25] J.Klimes, J. Sochor, P. Dolezal, J. Korner, *HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations*, International Journal of Pharmaceutics 217 (2001) 153-160
- [26] C. Arcelloni, R. Lanzi, S. Pedercini, G. Molteni, I. Fermo, A. Pontiroli, R. Paroni, *High-performance liquid chromatographic determination of diclofenac in human plasma after solid-phase extraction*, Journal of Chromatography B 763 (2001) 195-200
- [27] M. M. Sena, Z. F. Chaudhry, C. H. Collins, R. J. Poppi, *Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36 (2004) 743–749
- [28] Skoog, Holler, Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, Harcourt Brace & Company, 1998
- [29] C.K.O'Sullivan, G. G. Guilbault, *Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications*, Biosensors & Bioelectronics 14 (1999) 663-670
- [30] Juárez, J. A. G.-., Piezoelectric ceramics and ultrasonic transducers, J.Physics_(1989) 804-816
- [31] V. M. Mecea, *Is a quartz microbalance really a massa sensor?*, Sensors and Actuators A 128 (2006) 270-277
- [32] J.W.Bender, J. Krim, *Applications of the Piezoelectric Quartz Crystal Microbalance for Microdevice Development*, NewYork, 2004.

- [33] M. T. S. d. R. Gomes, *Desenvolvimento de sensores baseados em microbalanças de cristais piezoelétricos para a determinação de CO₂ e SO₂*, Universidade de Aveiro, 1996 (Tese de Doutoramento).
- [34] <http://www.cesam.ua.pt/index.php?menu=113&language=pt&tabela=geral>
(Consultado em 30/09/09)
- [35] R. L. Bunde, E. J. Jarvi, J. J. Rosentreates, *Piezoelectric quartz crystal biosensors*, *Talanta* 46 (1998) 1223-1236
- [36] P. L. Konash, G. J. Bastiaans, *Piezoelectric-crystals as detectors in liquid chromatography*, *Anal. Chem.* 52 (1980) 1929-1931
- [37] T. Nomura, M. Okuhara, *Frequency-shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids*, *Anal. Chim. Acta* 142 (1982) 281-284
- [38] K. K. Kanazawa, J. G. Gordon., *Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid*, *Analytical Chemistry* 57 (1985) 1770-1771
- [39] F. S. Damos, R. K. M., L. T. Kubota, *Aplicações de QMC, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (Bio)sensores*, *Química Nova* 27 (2004) 970-979
- [40] M. I. D. S. Veríssimo, *Aplicações analíticas de sensores de massa baseados em diferentes substratos piezoelétricos*, Universidade de Aveiro, 2003 (Tese de Doutoramento).
- [41] <http://sentidos5espsmm.blogspot.com/2008/01/pele.html>
(Consultado em 5/03/09)

- [42] K. Moser, K. Kriwet., A. Naik, Y. N. Kalia, R. H. Guy, *Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 52 (2001) 103-112
- [43] M. B. Brown, M. Hanpanitcharoen, G. P.Martin, *An vitro investigation into the effect of glycosaminoglycans on the skin partitioning and deposition of NSAIDs*, International Journal of Pharmaceutics 225 (2001) 113-121
- [44] A.A.M.Lira, *Estudo de permeação in vitro e avaliação térmica de emugel tópico à base de Lapachol*, Universidade Federal de Pernambuco, 2003
- [45] L. Baydoun, C. C. Muller-Goymann, *Influence of n-octenylsuccinate starch on in vitro permeation of sodium diclofenac across excised porcine cornea in comparison to Voltaren ophtha*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 56 (2003) 73-79
- [46] H.Piao, N.Kamiya, A.Hirata, T. Fujii, M. Goto, *A Novel Solid-in-oil Nanosuspension for Transdermal Delivery of Diclofenac Sodium*, Pharmaceutical Research 25 (2008) 4
- [47] K.Kriwet, C.C.Müller-Goymann, *Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum*, International Journal of Pharmaceutics 125 (1995) 231-242
- [48] T.R.Mollee, A.J.Bracken, *A Model of Solute Transport through Stratum Corneum Using Solute Capture and Release*, Bulletin of Mathematical Biology 69 (2007) 1887-1907
- [49] J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2ª Edição, Clarendon Press, Oxford, 1979
- [50] E. L. Cussler, *Diffusion: Mass transfer in fluid system*, Cambridge University, 2º Edição, 1997

- [51] A. Henning, U. F. Schaefer, D. Neumann, *Potencial pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 72 (2009) 324-331
- [52] G. L. Flynn, B. Stewart, *Percutaneous Drug Penetration: Choosing Candidates for Transdermal Development*, Drug Development Research 13 (1988) 169-185
- [53] L.S.C.Tomé, *Preparação e avaliação da permeabilidade de substratos de celulose modificados*, Universidade de Aveiro, 2008 (Tese de Mestrado)
- [54] M. Ansari, M. Kazemipour, M. Aklamli, *The study of drug through natural membranes*, International Journal of Pharmaceutics 327 (2006) 6-11
- [55] Convention, T.U.S.P., The United States Pharmacopeia: USP 31. 2007, Rockville (MD), USA
- [56] J. Fang, K.C.Sung, H. Lin, C. Fang, *Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various formulations: in vitro and in vivo studies*, International Journal of Pharmaceutics 178 (1999) 83-92
- [57] F.A.Mohammed, *Topical Permeation Characteristics of Diclofenac Sodium from NaCMC Gels n Comparison with Conventional Gel Formulations*, Drug Development and Industrial Pharmacy 27(10) (2001) 1083-1097
- [58] M.I.S. Veríssimo, M.T.S.R. Gomes, *The quality of our drinking water: Aluminium determination with an acoustic wave sensor*, Analytica Chimica Acta 617 (2008) 162-166

- [59] F. Damos, R.K. Mendes, L.T. Kubota, *Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores*, Química Nova 27 (6) (2004) 970-979